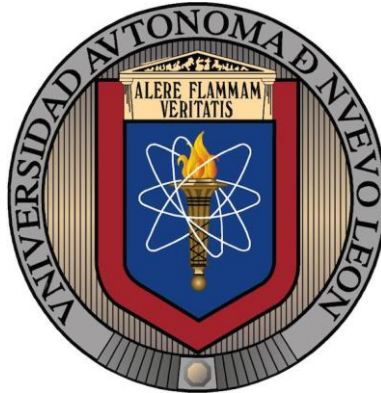


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



**EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL Y ANTIOXIDANTES EN LA
PLANTA DE TOMATE (*Solanum lycopersicon* L. Mill)
ENRIQUECIDA CON SELENIO**

Por

ROCÍO GUADALUPE CASTILLO GODINA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS**

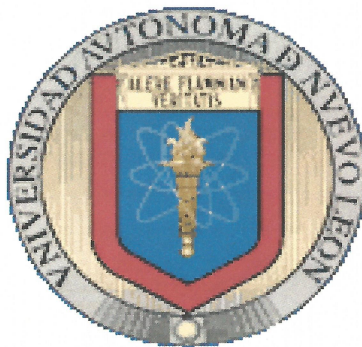
Con Acentuación en Manejo y Administración de Recursos Vegetales

Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., Noviembre 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



**EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL Y ANTIOXIDANTES EN LA
PLANTA DE TOMATE (*Solanum lycopersicon* L. Mill)
ENRIQUECIDA CON SELENIO**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS**

Con Acentuación en Manejo y Administración de Recursos Vegetales

Presenta

ROCÍO GUADALUPE CASTILLO GODINA

Dirección de Tesis

Dr. Rahim Foroughbakhch Pournavab

Director Interno

Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Director Externo

Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., Noviembre 2015

**EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL Y ANTIOXIDANTES EN LA
PLANTA DE TOMATE (*Solanum lycopersicon* L. Mill)
ENRIQUECIDA CON SELENIO**

Por

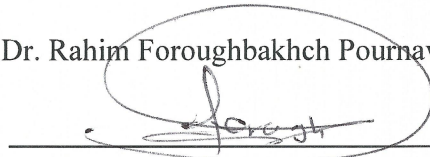
ROCÍO GUADALUPE CASTILLO GODINA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS**

Con Acentuación en Manejo y Administración de Recursos Vegetales

Comité de Tesis

Dr. Rahim Foroughbakhch Pournavab



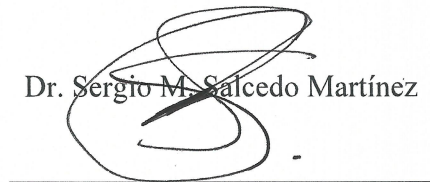
Presidente

Dr. Alejandra Rocha Estrada



Secretario

Dr. Sergio M. Salcedo Martínez



Vocal 1

Dr. Artemio Carrillo Parra



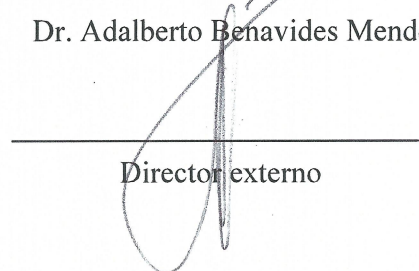
Vocal 2

Dr. Carlos Hernández Luna



Vocal 3

Dr. Adalberto Benavides Mendoza



Director externo

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme vivir y por elegir este plan de vida para mí, tan hermoso e inigualable, por colocarme los medios necesarios y a las personas indicadas en este camino.

A mis padres quienes me apoyan en todos los aspectos de mi vida. Las palabras nunca serán suficientes para agradecerles todo.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por aceptarme en el programa de doctorado y formar parte de ella. A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por abrirme las puertas en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por proporcionarme el apoyo económico.

Al Dr. Rahim Foroughbakhch Pournavab por confiar en mí desde el inicio y por aceptar dirigir esta tesis, por su valiosa aportación académica y profesional.

Al Dr. Adalberto Benavides Mendoza por asesorarme en el proyecto, por estar tan de cerca y pendiente de las necesidades del trabajo, además por su trato tan cálido, humano y comprensible en este trayecto profesional.

A mi comité de tesis, al Dr. Sergio M. Salcedo Martínez por sus aportaciones en cada seminario de avances y sus consejos en esta última etapa, a la Dra. Azucena Oranday Cárdenas por ser mi tutora en todo el programa de doctorado, a la Dra. Alejandra Rocha Estrada, al Dr. Carlos Hernández Luna y al Dr. Artemio Carrillo Parra por sus sugerencias para la mejora del proyecto.

A la Dra. Francisca Ramírez Godina por orientarme a iniciar el doctorado y que por su calidez humana y trayectoria académica, es para mí un ejemplo a seguir.

A mis hermanos César, Rubén y Gerardo, primeramente por existir en mi vida, por apoyarme de manera íntegra, total, sin restricciones, a cada uno por su tiempo, su calidez y por aportarme sus conocimientos.

A una amiga muy especial, Mary Santiago por estar siempre dispuesta a apoyarme y acompañarme no solo en el laboratorio, sino en mi vida personal.

A mi amiga y compañera Erika Rivas por acompañarme en toda mi formación académica, por alentarme a seguir adelante, por todos los momentos que hemos pasado juntas y porque el destino nos ha vuelto inseparables.

A mis amigos y compañeros del laboratorio UAAAN, a Julia Medrano, William Narváez, Lidia Valdez, Emma García, Juan Manuel Ramírez, a la Dra. Susana González y la Dra. Hermila García con quienes viví momentos de trabajo muy agradables y que además me aportaron en determinado momento un poco de todos sus conocimientos.

DEDICATORIAS

A DIOS omnipotente que gracias a su infinita presencia pude llegar a esta etapa de mi vida y a la culminación de este proyecto.

A ti mi niña, mi pequeña hija ARIADNE ROCÍO que eres la inspiración más grande en mi camino de vida y a quien visualizo en cada paso que doy.

A mis padres VENTURA y DELFINA quienes día a día me demuestran su amor e incansablemente su apoyo incondicional y por quienes he llegado hasta donde ahora estoy.

ÍNDICE

Sección	Página
Agradecimientos.....	i
Dedicatorias.....	iii
Índice de tablas.....	viii
Índice de figuras.....	ix
Lista de símbolos y abreviaturas.....	xi
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Generalidades del cultivo de tomate.....	3
2.1.1 Origen.....	3
2.1.2 Importancia comercial.....	3
2.1.3 Características botánicas del tomate.....	5
2.2 Antioxidantes.....	6
2.2.1 Generalidades de los antioxidantes en plantas.....	6
2.3 Antioxidantes no proteicos.....	7
2.3.1 Ácido ascórbico.....	7
2.3.2 Licopeno.....	9
2.4 Antioxidantes proteicos.....	11
2.4.1 Catalasa.....	11
2.4.2 Glutación peroxidasa.....	11
2.4.3 Superóxido dismutasa.....	13
2.5 Selenio.....	14
2.5.1 Generalidades del selenio.....	14
2.5.2 Biodisponibilidad del selenio.....	15

2.5.3 El selenio en plantas.....	16
2.5.4 Metabolismo del selenio en las plantas.....	17
2.5.5 Tolerancia de las plantas al selenio.....	18
2.5.6 Toxicidad del selenio en plantas.....	19
2.5.7 Impacto del selenio en la salud humana.....	20
2.6 Expresión génica.....	21
2.6.1 Transducción de señal.....	22
2.6.2 Mecanismo de transcripción.....	23
2.6.3 RNA-polimerasa.....	24
2.6.4 Estructura de un gen.....	24
2.6.5 Proceso transcripcional.....	25
2.6.6 Productos de transcripción.....	25
2.7 Manipulación de los genes involucrados en la asimilación del Se.....	26
2.8 JUSTIFICACIÓN.....	28
2.9 HIPÓTESIS.....	29
2.10 OBJETIVOS.....	30
2.10.1 Objetivo General.....	30
2.10.2 Objetivos Particulares.....	30
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 Localización del experimento.....	31
3.2 Siembra y acondicionamiento del invernadero.....	31
3.3 Trasplante y establecimiento y cuidado del cultivo.....	31
3.4 Producción de fruto.....	33
3.5 Variables agronómicas y calidad de frutos.....	33
3.5.1 Medición de las variables de crecimiento (altura y diámetro).....	33
3.5.2 Firmeza de frutos.....	33

3.5.3 Sólidos solubles totales de frutos.....	34
3.5.4 Materia seca total.....	34
3.6 Contenido de selenio y macronutrientes.....	34
3.6.1 Cuantificación de selenio, potasio, magnesio y calcio.....	34
3.6.2 Cuantificación de nitrógeno.....	35
3.6.3 Cuantificación de fósforo.....	36
3.7 Cuantificación de antioxidantes proteicos.....	36
3.7.1 Potencial de óxido-reducción.....	36
3.7.2 Cuantificación de proteínas totales.....	37
3.7.3 Actividad específica catalasa.....	37
3.7.4 Actividad específica glutatión peroxidasa.....	38
3.7.5 Actividad específica superóxido dismutasa.....	38
3.8. Cuantificación de antioxidantes no proteicos.....	39
3.8.1 Ácido ascórbico.....	39
3.8.2 Licopeno.....	39
3.9 Análisis de la expresión génica de frutos.....	40
3.9.1 Extracción y cuantificación de ARN.....	40
3.9.2 Síntesis de ADN complementario.....	41
3.9.3 RT- PCR semi cuantitativa.....	41
3.9.4 Densidad relativa.....	41
3.10 Diseño experimental y análisis estadístico.....	42
IV. RESULTADOS.....	44
4.1 Producción del Fruto.....	44
4.2 Cuantificación de variables agronómicas y calidad de frutos.....	44
4.3 Contenido de selenio y macronutrientes.....	46
4.3.1 Cuantificación de selenio.....	46
4.3.2. Cuantificación de macronutrientes.....	

4.4 Potencial de óxido-reducción de los frutos.....	48
4.5 Antioxidantes protéicos.....	48
4.5.1 Proteínas totales.....	48
4.5.2 Actividad enzimática.....	49
4.6 Antioxidantes no protéicos.....	51
4.6.1 Ácido ascórbico y licopeno.....	51
4.7 Expresión génica en los frutos.....	52
V. DISCUSIÓN.....	53
5.1 Producción de fruto.....	53
5.2 Variables agronómicas y de calidad de frutos.....	53
5.3 Cuantificación de selenio.....	54
5.4 Cuantificación de macronutrientes.....	55
5.5 Potencial de óxido-reducción.....	55
5.6 Antioxidantes protéicos.....	56
5.6.1 Actividad catalasa.....	56
5.6.2 Actividad glutatión peroxidasa.....	56
5.6.3 Actividad superóxido dismutasa.....	57
5.7 Antioxidantes no protéicos.....	57
5.7.1 Ácido ascórbico (AA) y licopeno.....	57
5.8 Expresión génica en los frutos.....	58
VI. CONCLUSIONES.....	59
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	60
IX RESUMEN BIOGRÁFICO.....	78
X. ANEXO.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Sección	Página
Cuadro 1. Tratamientos aplicados en una solución nutritiva de riego sobre el cultivo de la planta de tomate.....	32
Cuadro 2. Características de los iniciadores utilizados para la cuantificación de la expresión génica.....	42
Cuadro 3. Números de fruto por planta (NF) y peso de frutos por planta (PF) en tomate con aplicación de selenio (0, 2 y 5 mg L ⁻¹) en la solución nutritiva. Los datos corresponden a 3 cortes obtenidos a los 106, 113 y 120 ddt.....	44
Cuadro 4. Comparación de medias de las variables agronómicas y calidad de frutos evaluadas en tres fechas de muestreo en plantas de tomate con aplicaciones de selenio en solución nutritiva a tres diferentes concentraciones: 0, 2 y 5 mg L ⁻¹	45
Cuadro 5. Comparación de medias de la material seca total (MST) evaluada en plantas de tomate con aplicaciones de selenio en solución nutritiva a tres diferentes concentraciones: 0, 2 y 5 mg L ⁻¹	45
Cuadro 6. Concentración de elementos macronutrientes y selenio en los diferentes órganos de la planta de tomate con aplicaciones de selenio en solución nutritiva a tres diferentes concentraciones 0, 2 y 5 mg L ⁻¹ . Las concentraciones de N, P, K, Ca y Mg están dadas en porcentaje, el selenio en µg g ⁻¹	47
Cuadro 7. Características químicas de los frutos de tomate de plantas con aplicación de selenio (0, 2 y 5 mg L ⁻¹) en la solución nutritiva. Los datos corresponden a frutos colectados a los 120 ddt.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Sección	Página
Figura 1. Planta de tomate de crecimiento limitado e ilimitado respectivamente...	5
Figura 2. Estructura general del ácido ascórbico.....	8
Figura 3. Estructura del licopeno.....	10
Figura 4. Formas del selenio en función del pH y las condiciones de óxido reducción (Eh) del medio.....	15
Figura 5. Sistema de transducción de señal.....	23
Figura 6. Estructura de un gen eucariota.....	24
Figura 7. Proceso de transcripción.....	25
Figura 8. Concentración de selenio en hojas, tallos y frutos de tomate con aplicaciones de selenio en solución nutritiva; la concentraciones usadas se indican en el eje x (0, 2 y 5 mg L ⁻¹). Medias con la misma letra son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), esto se aplicó independientemente para cada órgano de la planta.....	46
Figura 9. Potencial de óxido-reducción bajo dos tratamientos de selenio (2 mg L ⁻¹ y 5 mg L ⁻¹ Se) y un testigo (0 mg L ⁻¹ Se).....	48
Figura 10. Cantidad de proteínas totales en hojas, tallos y frutos de tomate con aplicaciones de 0, 2 y 5 mg L ⁻¹ de selenio. Medias con el mismo nivel son igual de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), esta fue aplicada independientemente para cada órgano de la planta.....	49
Figura 11. Actividad específica catalasa en hojas, tallos y frutos de tomate con aplicaciones de 0, 2 y 5 mg L ⁻¹ de selenio. Medias con el mismo nivel son igual de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), esta fue aplicada independientemente para cada órgano de la planta.....	50
Figura 12. Actividad específica glutatión peroxidasa en hojas, tallos y frutos de	

tomate con aplicaciones de 0, 2 y 5 mg L⁻¹ de selenio. Medias con el mismo nivel son igual de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), esta fue aplicada independientemente para cada órgano de la planta..... 50

Figura 13. Actividad específica superóxido dismutasa en hojas, tallos y frutos de tomate con aplicaciones de 0, 2 y 5 mg L⁻¹ de selenio. Medias con el mismo nivel son igual de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), esta fue aplicada independientemente para cada órgano de la planta..... 51

Figura 14. Nivel de expresión de genes de antioxidantes de frutos de tomate de plantas con aplicación de selenio (0, 2 y 5 mg L⁻¹) en la solución nutritiva. Los valores mostrados indican la expresión relativa frente al testigo con un valor de 1..... 52

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	porcentaje	M	molar
μg	microgramos	g	gramos
nm	nanómetro	μL	microlitro
μmol	micromol	mU	miliunidad
L	litro	min	minutos
mg	miligramos	μM	micromolar
mM	milimolar	kg	kilogramos
ppm	partes por millón	mV	milivolts
ddt	días después del trasplante	cm	centímetro
L	litro	m	metros
h	hora	mm	milímetros
°C	grados centígrados	pH	pH
>	mayor que	≤	menor o igual que
fig	figura	et al	y colaboradores
msnm	metros sobre el nivel del mar	Se	selenio
Se ²	selenuro	Se ⁶⁺	selenato
Se ⁰	Selenio elemental	Se ⁴⁺	selenito
Se ²⁺	thioselenato	O ₂	Oxígeno singlete
–O ²	Anión superóxido	OH [–]	radical hidroxilo
α	alfa	β	beta
Fe ²⁺	fierro	Cu ²⁺	cobre
P	fósforo	S	azúfre

K	Potasio	Mg	Magnesio
Ca	Calcio	H ₂ O	agua
N	nitrógeno	I	yodo
Na ₂ SeO ₃	Selenito de sodio	H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
DMSe, (CH ₃) ₂ Se	Dimetil selenuro	DMDSe, (CH ₃) ₂ Se ₂	Dimetil diselenuro
CIO	hipoclorito	EC	ecuación
r	coeficiente de correlación	Eh	Oxido reducción del medio
ROS	Especies reactivas del oxígeno	ORP	Potenciómetro oxido- reducción
rpm	revoluciones por minuto	CAT	catalasa
GPX	Glutación peroxidasa	SOD	Superóxido dismutasa
NaOH	Hidróxido de sodio	H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
NH ₃	amoníaco	ANSA	ácido aminonaftol sulfónico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de sodio	NaH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de sodio
L-OO	radicales peróxidos	L-OOH	lipoperóxidos
UV-Vis	Ultravioleta visible	°Bx	grados brix
C ₄₀ H ₅₆	Formula molecular del licopeno	AA	Ácido ascórbico
NF	Número de fruto	PF	Peso de fruto
ALT	Altura de planta	DT	Diámetro de tallo
DP	Diámetro polar	DE	Diámetro ecuatorial
SST	Sólidos solubles totales	ICP	Plasma de acoplamiento inductivo

ECS	glutamilcisteína sintetasa	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
FeSOD	Superóxido dismutasa de fierro	MnSOD	Superóxido dismutasa de manganeso
CuZnSOD	Superóxido dismutasa de cobre y zinc	NiSOD	Superóxido dismutasa de níquel
GSH	Glutación reducido	CaCO ₃	Carbonato de calcio
SeCys	seleniocisteína	SeMet	seleniometionina
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana	pol	polimerasa
ADN	Ácido desoxiribonucleico	ARN	Ácido ribonucleico
ARNs	Ácidos ribonucleicos	rARNs,	Ácidos ribonucleicos ribosomales
mARNs	Ácidos ribonucleicos mensajeros	ARNsn's	Ácidos ribonucleicos pequeños nucleares
5S	peso molecular del ARN de la subunidad mayor del ribosoma	ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DEPC	Dietil pirocarbonato	DNTPs	Deoxinucleósidos trifosfato
MgCl ₂	Cloruro de magnesio	pb	pares de bases
g3f	Gliceraldehído 3 fosfato	5X	concentración 5X

ELISA	Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay	N	normalidad
kD	Kilodalton	<i>cat</i>	Gen catalasa
gpx	Gen glutatión peroxidasa	<i>sod</i>	gen superóxido dismutasa
<i>apx</i>	Gen ascorbato peroxidasa	<i>lic</i>	Gen licopeno

RESUMEN

La biofortificación tiene como finalidad incrementar la concentración de elementos biodisponibles en las plantas de cultivo para elevar la calidad nutricional. El selenio es un elemento traza de gran impacto para el metabolismo antioxidante de las plantas y su acumulación es pobre en especies como el tomate, de igual manera este elemento es esencial para los humanos, por lo que adicionarlo en las plantas forma parte de los programas de biofortificación. El propósito de este trabajo fue analizar experimentalmente la capacidad del selenito de sodio para incrementar la concentración de Se y modificar la actividad antioxidante en plantas de tomate. Para ello se usaron plantas de la variedad híbrido Toro y se aplicaron tres tratamientos 0, 2 y 5 mg L⁻¹ de selenito de sodio (Na₂SeO₃) utilizando como vehículo el agua de riego, los tratamientos fueron aplicados bajo un diseño experimental completamente al azar. Se llevaron a cabo tres muestreos 40, 80 y 120 días después del trasplante y la subsecuente cuantificación de la acumulación de selenio y macronutrientes en hojas, tallos y frutos así como su impacto en la producción de frutos bajo un diseño experimental completamente al azar. Se determinó la altura de la planta, los diámetros de tallos, firmeza, sólidos solubles de frutos y la materia seca total de los diferentes tejidos. Se obtuvo una cuantificación del potencial oxido reducción y de la actividad de antioxidante específicos como la catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, el ácido ascórbico y licopeno, para cada variable se llevó a cabo un análisis de varianza y posteriormente una prueba de comparación de medias de Tukey. La expresión de los genes *cat*, *gpx*, *sod*, *apx* y *lic* en los frutos fue también analizada y en este caso se aplicó un análisis de varianza no paramétrico de Fisher, para encontrar las diferencias entre tratamientos. Los resultados mostraron un incremento en la acumulación de Se, encontrándose hasta un 53.1% de aumento en la concentración en los frutos bajo el tratamiento 5 mg L⁻¹ en comparación con el testigo, sin embargo, este incremento no tuvo un impacto notorio en la producción y el rendimiento del tomate, a pesar de la existencia de una correlación de Spearman positiva ($r = 0.9637$) entre la producción de fruto y la concentración de Se. Los valores del potencial oxido-reducción se redujeron en promedio desde -41.4 mV para el tratamiento testigo y hasta -68.0 mV con el mayor tratamiento. Mientras tanto, la

concentración de Se si influyó positivamente en los parámetros de calidad incluyendo el ácido ascórbico (hasta un 50 % de aumento con el tratamiento 5 mg L⁻¹) y el licopeno (hasta un 66.9% de aumento con el mayor tratamiento). La actividad de las enzimas antioxidantes aumentó notablemente en el fruto con el tratamiento 5 mg L⁻¹ de selenito encontrándose 60.9% de aumento para CAT, 33.4% para GPX y 26.0% para SOD. En cuanto la expresión génica hubo mayor nivel de transcritos de los genes *gpx*, *sod* y *apx* bajo el tratamiento 2 mg L⁻¹.

ABSTRACT

Biofortification aims to increase the concentration of bioavailable elements in crop plants to improve the nutritional quality. Selenium is a trace element of great impact for the antioxidant metabolism of plants and their accumulation is poor in species such as tomato, just as this element is essential for humans, thus add it in plants is part of the programs biofortification. The purpose of this work was to test experimentally the ability of sodium selenite to increase the concentration of Se and change the antioxidant activity in tomato plants. Hybrid plants “Toro” variety and three treatments were used 0, 2 and 5 mg L⁻¹ of sodium selenite (Na₂SeO₃) using water as vehicle irrigation, treatments were applied under a completely randomized experimental design. There were conducted three samples 40, 80 and 120 days after transplantation and subsequent quantification of selenium accumulation and macronutrients in leaves, stems and fruits as well as its impact on fruit production under a completely randomized experimental design. The height of the plant, stem diameter, firmness, total dry matter of different tissues and fruit soluble solids were determined. Quantification of oxide reduction potential and specific antioxidant activity such as catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, ascorbic acid and lycopene was obtained, for each variable an analysis of variance was conducted and a Tukey test after. The expression of genes *cat*, *gpx*, *sod*, *apx* and *lic* was also analyzed and in this case a non-parametric analysis of variance of Fisher was applied to find the differences between treatments. The results showed an increased accumulation, being up to 53.1% more in concentration in the fruits under treatment 5 mg L⁻¹ than in the control, however, this increase did not have a notorious impact on production and yield of tomatoes, but it is noteworthy that positive Spearman correlation ($r = 0.9637$) was found between fruit production and concentration of Se. The values of the redox potential were reduced on the average, ranging from -41.4 mV with the control treatment to -68.0 mV with further treatment. Meanwhile, the Se concentration positively influenced the quality parameters including ascorbic acid (with an increase up to 50% with the treatment 5 mg L⁻¹) and lycopene concentration (up to 66.9% of increase with further treatment). The activity of antioxidant enzymes increased significantly with 5 mg L⁻¹ of sodium selenite, it was found an increase of 50.8% for

CAT, 29.1% for GPX and 26.0% for SOD. Gene expression level was higher for transcripts of genes *gpx*, *sod* and *apx* with 2 mg L⁻¹.

I. INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos saludables con alto contenido de nutrientes antioxidantes contribuye a la protección de las células del daño oxidativo y a la prevención de diversas enfermedades (Broadley et al. 2006). Los radicales libres provocan reacciones oxidativas en cadena que son eliminados por la acción del sistema antioxidante de defensa (Sahnoun et al. 1997), incluyendo enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX), de esta manera, al activarse este sistema antioxidante de defensa, puede proporcionarle a las plantas una mayor tolerancia frente al estrés ambiental por consecuente la generación de frutos de calidad. Las enzimas antioxidantes generalmente usan elementos traza tales como selenio (Se) así mismo cofactores, como es el caso de la GPX (Arthur 2003). Se piensa que el selenio es un elemento asociado con el metabolismo antioxidante (Lin et al. 2012; Feng et al. 2013) a través de su papel como cofactor de selenoenzimas (Combs 2001); su deficiencia podría inducir daños en el balance celular redox.

No se han establecido cuantitativamente los requerimientos por Se, más bien se han recomendado los niveles de ingesta en diferentes regiones del mundo. La ingesta recomendada por el National Research Council (1989) de los E.U.A es de $70 \mu\text{g día}^{-1}$ para hombres y $55 \mu\text{g día}^{-1}$ para mujeres; durante el embarazo y lactancia esta dosis se estima en $75 \mu\text{g día}^{-1}$. Mientras que Combs (2001) y Broadley et al. (2006) recomiendan hasta $300 \mu\text{g}$ por día para reducir el riesgo de diversas enfermedades como el cáncer. En humanos, la referencia de consumo en promedio de Se es de 60 a $75 \mu\text{g}$ por día, de acuerdo con los datos proporcionados por el National Research Council (1980); sin embargo, estos valores se encuentran muy por debajo de los niveles de consumo citado por Combs (2001) y Broadley et al. (2006). Hay países donde la falta de selenio en los suelos ha provocado problemas de salud para el ganado y en casos extremos también en la población humana como lo son: Nueva Zelandia, Finlandia, parte de E.U.A como en Beltsville y en la provincia de Keshan China (Combs y Combs 1986). El consumo en Caracas, Venezuela es 3 veces más alto que en Beltsville (Mondragón y Jaffé 1976). En Latinoamérica se observaron los valores más bajos de Se en Guatemala y moderadamente bajos de Ecuador y Brasil, mientras que muestras de Colombia,

Venezuela y México poseen niveles superiores al promedio (Jaffé et al. 1969). En México las estadísticas de consumo señalan un valor promedio de 40 $\mu\text{g dia}^{-1}$ (AMENAC 2009). Referente a la biodisponibilidad del Se, generalmente las plantas cultivadas que crecen en suelos no-seleníferos tienen bajas concentraciones de Se, que van de 0.01 a 1 mg kg^{-1} peso seco. Así, en algunos países donde los suelos son pobres en selenio, este se agrega a los fertilizantes utilizados para la producción agrícola (Broadley et al. 2006). Con base en lo anterior se ha planteado como estrategia para la mejora de la ingesta de selenio el enriquecimiento de los cultivos alimenticios con este elemento. El objetivo principal del presente trabajo fue: generar los conocimientos básicos acerca de los cambios en la expresión génica y en la capacidad antioxidante de la planta de tomate al aplicar selenio como selenito de sodio. Dicha especie fue utilizada como modelo biológico por ser caracterizada como no acumuladora de selenio (White et al. 2004).

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del cultivo del tomate

2.1.1 Origen

El origen del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicon* L. Mill) se localiza en la región andina que comprende a los países de Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú (Vavilov 1951) donde se encuentra la mayor variabilidad genética de tipos silvestres (Valadez 2001). Sin embargo muchos autores declaran que el centro de origen probablemente fue México, ya que aquí alcanzó un elevado grado de domesticación antes de ser llevado a Europa (Villarreal 1982). El Nombre tomate proviene de tomatl, en la lengua náhuatl de México (Nuez 2001).

2.1.2 Importancia comercial

El tomate es un cultivo de alto valor comercial y tiene una enorme importancia mundial, por la aceptación general del fruto en la alimentación y su utilización en forma variada, además de sus excelentes cualidades organolépticas y por su alto valor nutricional y contenido de licopeno y ácido ascórbico, demostrando que están inversamente relacionados con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer (Morales 2002). Dicho fruto es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio (Morales 2002).

Este fruto es la hortaliza más importante del mundo, constituye el 30% de la producción hortícola, con alrededor de 2.9 millones de hectáreas sembradas y 72 744 000 toneladas de frutos cosechados. Los países en vías de desarrollo contribuyen de manera significativa a la producción mundial con aproximadamente 47 283 600 toneladas, que representan el 65 % de dicha producción. Europa y Norte América contribuyen con el resto de la producción. (Vallejo y Estrada 2004).

En México, el tomate se ubica entre las cuatro primeras hortalizas de importancia económica. El comercio de tomate rojo mexicano depende en gran medida del mercado

estadounidense, incrementándose las exportaciones en los últimos 10 años en un 67%. En el 2000, México exportó 590 000 toneladas (80.8%) de tomate fresco a los Estados Unidos de Norteamérica seguido por Canadá (13.9) y los países bajos (5.3%) de acuerdo con (FAS-USDA 2001), en ese mismo año, el tomate mexicano aportó 12.8% del valor de las exportaciones agropecuarias en México (3655.2 millones de dólares) y 25.4% del valor de las exportaciones de legumbres y hortalizas frescas (INEGI 2001).

La importancia del tomate mexicano en el mercado estadounidense se relaciona con la cercanía geográfica, competitividad en el precio y calidad, sabor, vida de anaquel y con el descenso de la producción del tomate en los Estados Unidos De Norteamérica en el invierno. A nivel mundial en la producción de tomate, México se encuentra en el décimo lugar, sin embargo, ocupa el primer lugar en exportación del fruto según datos de la SAGARPA (SIAP 2012). Los estados con mayor aportación son Sinaloa, Baja California, Michoacán, Zacatecas y Jalisco (SIAP 2012).

2.1.3 Características botánicas del tomate

Reino: Plantae, División: Spermatophyta, Clase: Dicotyledoneae, Orden: Solanales, Familia: Solanaceae, Genero: *Solanum*, Especie: *lycopersicon*, Nombre científico: *Solanum lycopersicon* L. Mill. Nombre común: tomate (Saldaña et al. 2003).

El tomate es una planta de porte arbustivo que se cultiva como anual. Puede desarrollarse de manera rastrera, semierecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado o de crecimiento ilimitado (Nuño et al. 2007) como indica la Figura 1.



Figura 1. Planta de tomate de crecimiento limitado e ilimitado respectivamente

La planta presenta una raíz principal pivotante, crece unos 3 cm al día hasta alcanzar los 60 cm de profundidad, simultáneamente se producen raíces adventicias y ramificaciones que pueden llegar a formar una masa densa y de cierto volumen. Sin embargo, este sistema radical puede ser modificado por las prácticas culturales de tal forma que cuando la planta procede de un trasplante, la raíz pivotante desaparece siendo mucho más importante el desarrollo horizontal (Rodríguez et al. 2001). El tallo es erguido y cilíndrico en plantas jóvenes, a medida que esta crece, el tallo cae y se vuelve anguloso, presenta una ramificación abundante y yemas axilares, si al final del crecimiento todas las ramificaciones exhiben yemas reproductivas, estas se clasifican como de crecimiento determinado, y si terminan con yemas vegetativas, son de crecimiento indeterminado (Rodríguez et al. 2001). Las hojas son compuestas, se insertan sobre los diversos nudos de forma alterna, el limbo se encuentra fraccionado en siete, nueve y hasta once foliolos. Las flores son pequeñas, pedunculadas de color

amarillo, formando corimbos axilares. La flor está formada por un pedúnculo corto, el cáliz es gamosépalo, es decir, con los sépalos soldados entre sí y la corola gamopétala. El androceo tiene cinco o más estambres adheridos a la corola con las anteras que forman un tubo. El gineceo presenta de dos a treinta carpelos que al desarrollarse darán origen a los lóculos o celdas del fruto. Los frutos de tomate son bayas carnosas con diferencias en formas (lisa, asurcado, aperado, etc.) e intensidad de coloración, de rojiza o amarillo en caso de ciertas variedades de tomate, con cavidades o lóculos internos variables, en donde se desarrollan las semillas de forma reniforme y aplanadas (COVECA 2010). Las semillas son de forma lenticular con dimensiones promedio de 5x4x2 milímetros y está constituida por el embrión, el endospermo y la testa o cubierta seminal. El embrión lo forman una yema apical, dos cotiledones, el hipocótilo y la radícula. La testa o cubierta seminal es el tejido duro e impermeable (COVECA 2010).

2.2 Antioxidantes

2.2.1 Generalidades de los antioxidantes en plantas

Los antioxidantes son compuestos que permiten la vida celular en un ambiente oxidante y son los responsables de la eliminación de los radicales libres los cuales se producen, de manera natural, en los sitios de actividad energética celular. La función química de los antioxidantes es ceder potencial reductor a los compuestos oxidantes capaces de dañar a los componentes celulares (Benavides et al. 2009). Los organismos poseen numerosos sistemas de defensa antioxidantes regulables, enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, GSH peroxidasa, quinona reductasa y hemoxigenasa) y no enzimáticos (selenio, zinc, ácido ascórbico, α -tocoferol y carotenoides) que son los encargados de evitar estos factores (Murillo et al. 2007). Estas respuestas de defensa se desencadenan por factores bióticos tales como patógenos, plagas y simbiontes o por factores abióticos como alta o baja temperatura, radiación, salinidad, entre otros y no necesariamente en condiciones que originan estrés (Benavides et al. 2009).

En las plantas una de las más rápidas reacciones de defensa al ataque por patógenos es la llamada explosión oxidativa, la cual constituye la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente O_2^- y H_2O_2 en el sitio de invasión y para la

eliminación del exceso de estas ROS, la planta ha diseñado estrategias dependiendo del sitio donde se encuentren, existiendo dos mecanismos de acción; enzimáticos y no enzimáticos (Miranda y Castro 2009).

El papel del selenio como un antioxidante en pastos sugiere que la adición al suelo puede mejorar la calidad del forraje, por la disminución de la senescencia y persistencia de la pastura (Cartes et al. 2005). Estudios realizados indican que este elemento se asocia a cambios en el estado redox celular, esto a su vez se relaciona con la habilidad de las plantas a tolerar el estrés ambiental. El selenio es un constituyente esencial de un número de enzimas, algunas de las cuales tienen funciones antioxidantes (Raymond 2002). Recientemente se ha demostrado que el selenio aumenta la capacidad antioxidante y la tolerancia al estrés en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) y plantas de ballico (*Lolium perenne* L.) además en un estudio realizado aplicando selenio en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*), los resultados sugirieron que el Se es un antioxidante y que activa los mecanismos de protección, que pueden curar el estrés oxidativo en los cloroplastos (Seppanen et al. 2003).

2.3 Antioxidantes no proteicos

2.3.1 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es un importante antioxidante hidrosoluble que actúa potenciando el efecto de otros antioxidantes; tal como sucede como el α -tocoferol y el selenio. Es un aceptor de radicales muy efectivo frente al superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hipoclorito (ClO) y radicales hidroxilo (OH^\cdot) de acuerdo con Yanishlieva y Maslarova (2001). Sus principales funciones son neutralizar el oxígeno singlete (O_2), capturar los radicales hidroxilo y aniones superóxido y regenerar la forma oxidada del α -tocoferol una vez que ha reaccionado con un radical libre (Shekelle et al. 2003).

Contiene varios elementos estructurales que contribuyen a su comportamiento químico: la estructura de la lactona y dos grupos hidroxilos enólicos, así como un grupo alcohol primario y secundario (Figura 2).

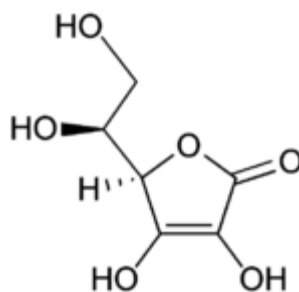


Figura 2. Estructura general del ácido ascórbico

El ácido ascórbico es un inhibidor de la oxidación de lípidos, regenera α -tocoferol y ofrece protección contra todo tipo de cáncer; es un elemento indispensable en los procesos metabólicos del cuerpo humano (Johnson 2001).

En las plantas el ascorbato es el antioxidante cuantitativamente predominante en las células vegetales, se encuentra en todos los compartimentos subcelulares, incluido el apoplasto, en concentraciones que oscilan entre 2-25 mM. El ascorbato es oxidado por el oxígeno, el anión super óxido, el oxígeno singlete y el peróxido de hidrogeno para dar lugar al radical monodehidroascorbato, el cual se desproporciona en ascorbato o dehidroascorbato (Smirnoff 2000). Desempeña en las plantas un papel fundamental en la foto protección y la regulación de la fotosíntesis y preserva las actividades de enzimas que tienen iones metálicos de transición (Cu^{2+} , Fe^{2+}) como grupo prostético. El ascorbato es también un poderoso antioxidante secundario, ya que reduce la forma oxidada del α -tocoferol. Adicionalmente, es el reductor utilizado para la hidroxilación de residuos de prolina de la extensina, una proteína de la pared celular. También está implicado en la elongación de la raíz, el funcionamiento de los estomas y desempeña una función crítica asociada a los mecanismos a través de los cuales las plantas sensan los cambios medio ambientales y responden a ellos (Noctor y Foyer 1998; Foyer y Noctor 2005). Este antioxidante está presente en las frutas y verduras en forma de ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico (Johnson 2001). El tomate tiene altos contenidos de

ácido ascórbico lo cual desempeña un papel importante en la prevención de enfermedades degenerativas, cáncer, desórdenes neurológicos y de la vista, protege a las células del cerebro y medula espinal, ayuda al desarrollo de dientes y encías, huesos, crecimiento, reparación del tejido conectivo normal, absorción de hierro, producción de colágeno, metabolización de grasas y cicatrización de heridas. Es difícil aumentar la cantidad por la elevada influencia que el ambiente tiene en la acumulación de ácido ascórbico en tomate (Galiana-Balaguer et al. 2008). Otros autores mencionan que el contenido promedio de ácido ascórbico en tomate es de $18.89 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ peso fresco (Galiana-Balaguer et al. 2008).

2.3.2 Licopeno

En general, los carotenoides han cobrado gran importancia debido a que son antioxidantes que neutralizan los radicales libres que dañan a las células, y de ellos, el licopeno es el que tiene las propiedades más sobresalientes (Yeung 2001). El tomate es una fuente importante de licopeno además de otros carotenoides como el β caroteno (Madhavi y Salunkhe 1998). Ambos, el licopeno y el β caroteno son importantes antioxidantes de defensa en contra de la peroxidación lipídica en las células (Agarwal et al. 2005).

El licopeno es un hidrocarburo alifático que pertenece a la familia de los carotenoides, tiene una estructura que consiste en una larga cadena de dobles enlaces conjugados con dos anillos extremos abiertos. La estructura del licopeno ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$, peso molecular: 536.85) es la más larga de los carotenoides; este hidrocarburo insaturado contiene 13 dobles enlaces carbono-carbono, de los cuales 11 están conjugados y dispuestos en una matriz lineal (Figura 3). Estos dobles enlaces conjugados son responsables del vibrante color rojo de licopeno (Clinton 1998). El licopeno es un compuesto lipófilo que es insoluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos y tiene una capacidad de extinción constante al doble que la del β caroteno y 10 veces mayor al α tocoferol (Hadley et al. 2003). La capacidad de extinción está directamente relacionada con la posición de los niveles de energía del estado excitado, que dependen de la longitud de la cadena doble de carbono conjugado (Young y Lowe 2001).

En variedades comunes de tomate, la concentración de licopeno es de 3 a 12.2 mg 100g⁻¹ de fruta madura (Arias et al. 2000; Khachik et al. 1992; Martínez-Valverde et al. 2002; Tonucci et al. 1995). Por su parte, Anguelova y Warthesen (2000a) mencionan que el contenido inicial total de licopeno en tomate en polvo comercial es de 821 µg g⁻¹ de sólidos secos para el polvo obtenido por el proceso “cold break”, y 883 µg g⁻¹ de sólidos secos para el obtenido por el proceso “hot break”.

La degradación del licopeno no sólo afecta el atractivo color de los productos finales, sino también su valor nutritivo (Ré et al. 2002). La causa principal del deterioro en los carotenoides es la oxidación, que es mayor cuando se pierde la integridad celular. El alto grado de insaturación los hace fácilmente oxidables, siendo especialmente sensibles a la luz, calor y oxígeno (Mínguez- Mosquera 1997). Otros factores físicos y químicos que se sabe degradan otros carotenoides, son temperaturas elevadas, exposición a la luz, al oxígeno y pH extremos (Nguyen y Schwartz 1999). Además de la degradación oxidativa, con facilidad se lleva a cabo la isomerización *cis-trans* (Shi y Le Maguer 2000). La autooxidación del *all-trans* licopeno y los *cis* isómeros ocurren paralelamente a la *trans-cis* isomerización, causando una división de la molécula de licopeno en fragmentos más pequeños tales como aldehídos y cetonas volátiles desarrollando sabores. En productos procesados de tomate la isomerización y autooxidación causan una disminución del contenido de licopeno, una reducción en la proporción de licopeno *all-trans*, pérdida de color y la formación de sabores desagradables (Anguelova y Warthesen 2000a).

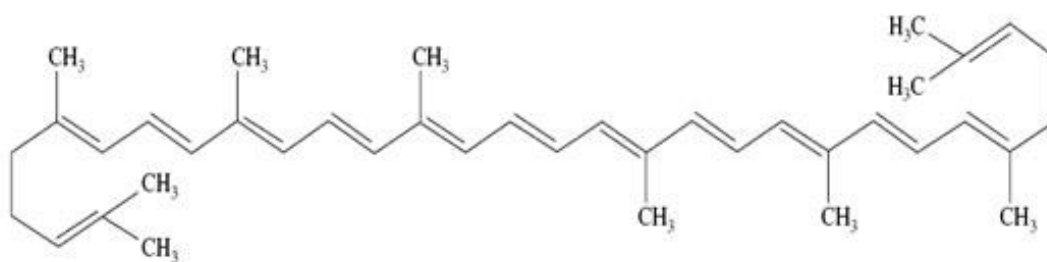


Figura 3. Estructura del licopeno

2.4 Antioxidantes proteicos

2.4.1 Catalasa (EC 1.11.1.6)

La catalasa (CAT) es una de las enzimas de las oxidoreductasas más abundantes en la naturaleza. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas (Chance y Maehly 1955). Esta enzima es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kD. Consta de 4 subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX y el contenido protohémico y el de hierro representan un 1,1 % y 0,09 % respectivamente del peso molecular total de la enzima (Hadju et al. 1977).

La CAT como parte del sistema antioxidante está involucrada en la destrucción del H_2O_2 generado durante el metabolismo celular. Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero relativamente poca afinidad por el sustrato. En la reacción peroxidativa la enzima puede utilizar como donadores de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol y formaldehído (Havir y McHale 1989). Esta función se puede realizar con monómeros, dímeros y tetrámeros (Srivastava y Ansari 1980). (Ecuación 1)



2.4.2 Glutación Peroxidasa (EC 1.11.1.9)

La glutación peroxidasa (GSH-Px) es una enzima selenio (Se) dependiente que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua y alcohol así como de los peróxidos de ácidos grasos (hidroperóxidos orgánicos o lipo peróxidos (L-OOH)), utilizando como agente reductor el glutatión reducido (GSH). Se conoce que los L-OOH son tóxicos en los tejidos vegetales y que dan lugar a especies reactivas del oxígeno como los radicales peróxidos (L-OO), que son compuestos indeseables para los

organismos vivos (Maiorino et al. 1991). Como parte del mecanismo de defensa antioxidante, la GSH-Px evita la oxidación de los L-OOH. Los peróxidos son reducidos mediante la reacción general catalizada por esta enzima en la cual el glutatión reducido (GSH) actúa como donante de hidrogeno (Ecuación 2), esta reacción produce hidróxidos que son elementos potencialmente dañinos y que al oxidarse se convierten en radicales alcohólicos, para los que no se conoce enzima que los metabolice (Maiorino et al. 1991). El sistema antioxidante de las plantas incluye un conjunto amplio de compuestos de naturaleza proteínica, entre las que se encuentran las enzimas antioxidantes como la GPX entre otros (González et al. 2000).



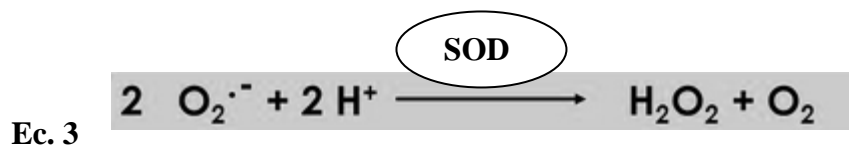
Lo que comúnmente se le conoce como glutatión es el glutatión reducido (GSH). Este tripéptido que existe abundantemente en los cloroplastos es sintetizado en dos pasos, catalizados por la glutamylcysteína sintetasa (ECS) y la glutatión sintetasa, siendo el primero de ellos, el paso limitante de su biosíntesis en plantas (Ogawa 2005). El glutatión se caracteriza por ser un compuesto tiólico no proteico y presenta una alta capacidad de donar electrones, el 90% del glutatión se encuentra normalmente en su estado reducido. El glutatión oxidado puede de nuevo ser reducido a GSH por acción de la glutatión reductasa que utiliza NADPH como poder reductor (Li et al. 2004).

Se ha encontrado que el glutatión está involucrado en diferentes procesos en las plantas, entre los que destacan la diferenciación, la muerte celular programada, la senescencia, la regulación del ciclo celular, la floración, la acumulación de pigmentos y la destoxificación de xenobióticos y metales pesados. Recientemente se le ha asignado un papel como regulador de crecimiento y como inductor de genes de defensa (Ogawa 2005).

2.4.3 Superóxido dismutasa (EC. 1.15.1.1)

La superóxido dismutasa representa la primera línea de defensa de las células frente al estrés oxidativo. Cataliza la conversión del radical anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (Ecuación 3). Como las concentraciones del O_2^- son normalmente bajas, la reacción depende de su difusión. Sin embargo, la asociación de la enzima con su sustrato no es una simple cuestión de difusión y colisión. La estructura submolecular de la enzima, la distribución de carga electrostática, interacciones de apantallamiento por solventes inter e intramoleculares, y las interacciones hidrodinámicas, pueden afectar tanto la difusión del O_2^- como su asociación con la enzima. Se ha encontrado que el campo eléctrico de la SOD favorece 30 veces la velocidad de asociación del anión (Garcia-Triana et al. 1995)

La actividad SOD ha sido detectada en una amplia variedad de seres vivos, desde bacterias a humanos, implicada como defensa esencial frente a la toxicidad potencial del oxígeno. Cualquier célula que utilice el oxígeno tiene el potencial de producir anión superóxido y, por tanto, debe contener alguna forma de superóxido dismutasa (Fridovich 1974). Las superóxido dismutasas constituyen una familia de metaloenzimas que se clasifican en cuatro grupos según el metal que actúe de cofactor: FeSOD, MnSOD, CuZnSOD y NiSOD, esta última descrita recientemente en *Streptomyces* (Lynch y Kuramitsu 2000). En eucariotas existen 3 tipos de SODs de diferente localización, que en su conjunto contribuyen a la regulación de las concentraciones de este radical. Ellas son: Mn-SOD mitocondrial, CuZn-SOD citosólica y CuZn-SOD extracelular (Garcia-Triana et al. 1995).



2.5 Selenio

2.5.1 Generalidades del selenio

El selenio es un elemento mineral natural, distribuido en la naturaleza en la mayoría de las rocas y suelos; en forma pura existe en forma de cristales hexagonales de color gris metálico a negro, pero en la naturaleza generalmente está combinado con sulfuro o con minerales de plata, cobre, plomo y níquel (ATSDR 2009). Este mineral fue identificado como nuevo elemento químico en 1818 por J. J. Berzelius en Gripsholm, Suecia. Fue aislado del residuo color rojo producido durante la oxidación del dióxido de azufre proveniente de piritas de cobre para la producción de ácido sulfúrico (Terry et al. 2000).

El Se es un elemento químico del grupo 16, encontrándose justo abajo del azufre en la tabla periódica, dándole así propiedades químicas similares a este último elemento (Cruz-Jiménez 2005), el selenio tiene variedad en sus estados de oxidación como seleniuro (Se^{2-}), selenio elemental (Se^0), selenito (Se^{4+}) y selenato (Se^{6+}). Las formas oxidadas del selenio (Se^{4+} y Se^{6+}) son absorbidas por las plantas debido a su elevada solubilidad, sin embargo el Se^0 y el Se^{2-} son insolubles, por lo cual difícilmente son absorbidas por las plantas (Broadley et al. 2006).

El selenio es un oligoelemento que puede funcionar como un nutriente esencial para los seres humanos, plantas y animales o como un medio tóxico; el límite es muy estrecho y depende de su forma química, la concentración y variables ambientales. Se considera un microelemento importante, existe en pequeñas cantidades en todos los seres vivos y aunque es un nutriente traza esencial importante para los seres humanos y en la mayoría de los animales como un antioxidante, puede presentar toxicidad, que se produce a altas concentraciones debido a la sustitución de azufre con selenio en los aminoácidos resultando en el plegamiento incorrecto de las proteínas y enzimas que en consecuencia son no funcionales (Fan et al. 2002; Shardendu et al. 2003).

2.5.2 Biodisponibilidad del selenio

El selenio (Se) se encuentra ampliamente distribuido entre los materiales de la corteza terrestre aunque de forma poco uniforme (Magos y Berg 1988). En la mayoría de suelos las concentraciones de Se, varían entre 0.01 y 2 mg Kg⁻¹ (Mayland 1994), mientras que concentraciones elevadas de Se, se asocian generalmente a suelos formados a partir de materiales sedimentarios de origen marino (Presser 1994). Fordyce (2005) señala que en la mayoría de los suelos del mundo las concentraciones de selenio son bajas, alcanzando de 0.01 a 2.0 mg Kg⁻¹ y una media de 0.4 mg Kg⁻¹, aunque pueden encontrarse concentraciones >1200 mg Kg⁻¹, en suelos denominados seleníferos.

La cantidad de selenio en el suelo puede ser clasificada con base en los niveles del mismo encontrados en plantas que no lo acumulan, pero que crecen en dicho suelo, o bien de acuerdo al nivel de selenio en el propio suelo (Davis 2002). La especie química de selenio en ambientes está determinada por una variedad de factores físicos, químicos y biológicos, los cuales están asociados con cambios en su estado de oxidación (Figura 4).

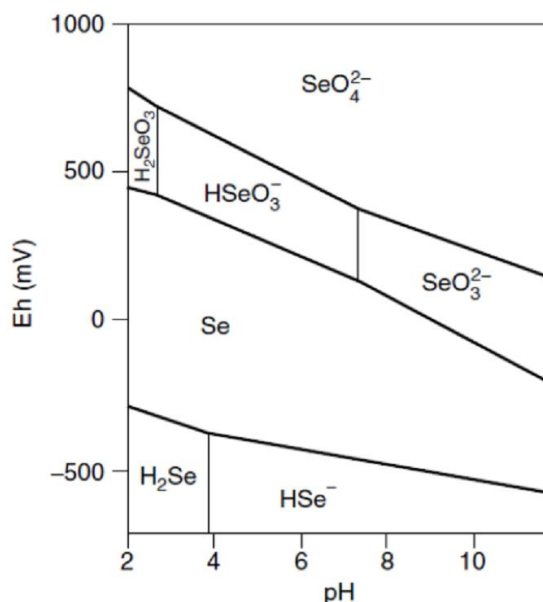


Figura 4. Formas del selenio en función del pH y las condiciones de óxido reducción (Eh) del medio (Combs 2001).

De manera similar al elemento del azufre, el selenio puede existir en cinco estados de oxidación: 1. selenuro (2^-), 2. selenio elemental Se(O) , 3. thioselenato (2^+), 4. selenito (4^+) y 5. selenato (6^+) de acuerdo con Reamer y Soller (1980). Las diferentes formas de selenio determinan su solubilidad y en consecuencia su disponibilidad. Los selenatos (6^+) es la forma más oxidada de selenio, son altamente solubles en agua y es considerada la forma más toxica. Los selenitos (4^+) se encuentran en ambientes óxicos y subóxicos y son menos disponibles para los organismos, en virtud de su alta afinidad por los sitios de absorción de sedimentos y constituyentes del suelo. Bajo condiciones anóxicas el selenio elemental y los selenuros (2^-) son las formas termodinámicamente más estables. El selenio elemental es relativamente insoluble y los selenuros (2^+) precipitan como metales de selenuros (2^-) de muy baja solubilidad. Los compuestos de selenio orgánico (2^-) tales como la selenometionina y la selenocisteína pueden acumularse en el suelo en forma de sedimentos o mineralizarse a selenio inorgánico. De esta manera, $\text{Se } (6^+)$, $\text{Se } (4^+)$ y el $\text{Se } \text{orgánico } (2^-)$ son las formas solubles más importantes en ambientes naturales (Zhang et al. 1999). El selenio también existe en formas volátiles, como los dimetilselenuros (DMSe , $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$) y los dimetildiselenuros (DMDSe , $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$) según Fan et al. (2002).

2.5.3 El selenio en las plantas

El selenio no ha sido clasificado como un elemento esencial para las plantas, aunque en el papel se ha considerado que es beneficioso en plantas capaces de acumular grandes cantidades del elemento (Terry et al. 2000). La captación y acumulación de selenio por las plantas es determinado por la forma química y la concentración, los factores del suelo tales como el pH, la salinidad y el contenido de CaCO_3 , la identidad y la concentración de iones competitivos, y la capacidad de la planta para absorber y metabolizar selenio (Kabata-Pendias y Pendias 2001), activamente tejidos en crecimiento por lo general contienen las mayores cantidades de selenio (Kahakachchi et al. 2004).

Todas las formas de selenio han sido encontradas en hojas, tallos y raíces de plantas, pero las plantas suelen acumular más selenio en los brotes y hojas que en los tejidos de la raíz (Zayed et al. 1998). Las plantas cultivadas que crecen en suelos no seleníferos, presentan concentraciones de selenio de 0.01 a 1 mg Kg⁻¹ de peso seco (Marschner 2002). Debido a que las plantas difieren en su capacidad de acumulación, se les ha clasificado en tres grupos; 1) Acumuladoras de selenio, 2) No acumuladoras de selenio, 3) Acumuladoras secundarias de selenio. En el primer grupo se encuentran diversas especies de los géneros *Astragalus*, *Stanleya*, *Morinda*, *Neptunia*, *Oonopsis* y *Xylorhiza*; acumulando selenio desde cientos hasta varios miles de miligramos de selenio por kilogramo de peso seco en sus tejidos. En el segundo grupo, se incluyen la mayoría de las especies forrajeras, plantas cultivadas, así como los pastos conteniendo menos de 25 mg Kg⁻¹ de peso seco y no acumulan selenio por arriba del límite de 100 mg Kg⁻¹ de peso seco cuando crecen en suelos seleníferos (Brown y Shrift 1982). Las especies no acumuladoras contienen altas concentraciones de selenometionina, mientras que las altas acumuladoras contienen cantidades mínimas de selenometionina y grandes cantidades de las formas inorgánicas como selenato y selenito de sodio (Mayland 1994; Wu 1998). La tercera categoría de plantas (también llamadas semi acumuladoras) crecen en suelos que contienen niveles medios o altos de selenio y acumulan hasta 1000 mg Kg⁻¹ de peso seco. Recientemente se han identificado especies de Brassicae de rápido crecimiento como la mostaza india (*Brassica juncea*) y canola (*B. napus*), como nuevas especies acumuladoras secundarias de selenio, con una concentración de algunos cientos de mg Kg⁻¹ Se, de peso seco en tallos, cuando crecen en suelos contaminados con niveles moderados de Se (Bañuelos et al. 1997).

2.5.4 Metabolismo del selenio en las plantas

El selenio es metabolizado en las plantas por la vía de asimilación del azufre y su distribución y acumulación dependerá de la especie química y de la concentración del elemento suplementado por irrigación y a través de las hojas, así como por vía de la naturaleza y la concentración de otras sustancias presentes en el suelo (Terry et al. 2000). En el medio ambiente, el selenio puede ser liberado por procesos naturales o inducido por la actividad humana y llega a ser incorporado al suelo y el agua (White et

al. 2004). El selenio es movilizado en las células de la planta por diferentes procesos dependiendo de su forma química. Así, el selenato (Se^{+6}) puede ser movilizado a través de un proceso de transporte primario acoplado a una H^{+} -ATPasa con la ayuda de un transportador de sulfato (Terry et al. 2000) o de silicio (Zhao et al. 2010); una vez absorbido por la planta, permanece en forma inorgánica (sin sufrir alteraciones), es incorporado en proteínas que contienen selenio, siguiendo la ruta metabólica del azufre, pudiendo ser incorporado de manera no específica dentro de compuestos de bajo y alto peso molecular o formando parte de especies de selenio no proteicas evitándose así la adición de Se-aminoácidos dentro de las proteínas de acuerdo con Montes y Bayón et al. (2002). Cantidades mínimas de selenio han incrementado el crecimiento de algunas especies de plantas. Bajas concentraciones de este elemento inhiben la peroxidación de lípidos en *Lolium perenne*, y esta disminución coincide con un mayor crecimiento (Hartikainen et al. 2000). Las plantas absorben el selenio del agua, suelo o sedimentos y pueden acumularlo en sus tejidos y volatilizarlos. Los selenatos son tomados por la planta de una manera preferente sobre los selenitos y acumulado tanto en raíces como en la parte aérea. En contraste, la absorción del selenito (Se^{+4}) ocurre de manera diferente (Terry et al. 2000), esto es a través de un transportador de fosfato (Zhao et al. 2010). Una vez absorbido, el selenito adopta una forma orgánica (De Souza et al. 1998, Cartes et al. 2006) y se ha demostrado que es un inductor más eficiente de la actividad de glutatión peroxidasa (Cartes et al. 2005).

2.5.5 Tolerancia de las plantas al selenio

El principal mecanismo de tolerancia al selenio es la reducción de la concentración intracelular de SeCys y SeMet las que de otra manera pueden ser incorporadas dentro de proteínas con efectos perjudiciales en la función de la planta. Un mecanismo alternativo para la exclusión de selenio de las proteínas puede ser mediante la capacidad de los acumuladores de selenio, para discriminar contra la incorporación de los selenoaminoácidos dentro de las proteínas (Burnell y Shrift 1979).

Otro aspecto relacionado con la tolerancia a selenio, es la capacidad de las plantas para volatilizarlo (fitovolatilización). Las tasas de la volatilización varían

también considerablemente entre especies; por ejemplo, con un abastecimiento de 10 μM de selenato; arroz, brócoli y calabaza volatilizaron entre 200 y 350 $\mu\text{M Se m}^{-2}$ de área foliar por día, comparado con menos de 15 $\mu\text{g Se m}^{-2}$ de área foliar por día en remolacha azucarera, lechuga y cebolla (Terry et al. 1992).

2.5.6 Toxicidad del selenio en plantas

Cuando las plantas son expuestas a altas concentraciones de selenio presentan diferentes síntomas de daños, como: inhibición de crecimiento, clorosis, hojas blanquecinas y quebradizas, disminución de la síntesis de proteínas y una muerte prematura de la planta (Mengel y Kirkby 1987).

La cantidad de selenio que pueden absorber las plantas sin que presenten síntomas de toxicidad, varía de manera muy significativa entre plantas acumuladoras de selenio y las no acumuladoras. La concentración crítica de selenio en tejido en plantas no acumuladoras, que resulta en una reducción del 10% en el rendimiento varía en 2 mg Kg^{-1} Se, en arroz a 330 mg Kg^{-1} Se, en trébol blanco, por otro lado las plantas acumuladoras de selenio pueden presentar concentraciones en exceso de 4.000 mg Kg^{-1} Se, sin exhibir cualquier efecto negativo que afecte su crecimiento y desarrollo (Mikkelsen et al. 1989). La tolerancia a selenio puede incrementarse con el aumento en el abastecimiento de sulfatos, con lo cual el umbral en la concentración de selenio puede ser o no siempre la misma (Mikkelsen et al. 1989).

La biodisponibilidad del selenio como un nutrimento o como agente tóxico depende altamente de las especies de Se presentes (Zhang y Gladyshev 2001). Selenatos y selenitos son las formas principales en las que el selenio puede ser tóxico para las plantas.

El principal mecanismo por el que una alta acumulación de selenio en planta induce la toxicidad por selenio está asociado con la incorporación de selenocisteína (SeCys) y selenometionina (SeMet) en las proteínas, en sustitución de cisteína (Cys) y metionina (Met), respectivamente (Brown y Shrift 1982). Las diferencias en tamaño y propiedades de ionización entre el azufre y el selenio, conducen a alteraciones

significativas en la estructura de la proteína. El enlace entre dos átomos de selenio es aproximadamente un séptimo más largo (distante) y un quinto más débil que el enlace disulfuro. De esta manera, la incorporación de la SeCys en lugar de la Cys dentro de la proteína puede interferir en la formación de puentes disulfuro, lo que origina alteraciones en la estructura terciaria de la S-proteínas y en un efecto negativo en su actividad catalítica.

Este elemento induce clorosis, posiblemente a través de un efecto adverso en la producción de porfobilinógenosintetasa, una enzima requerida para la síntesis de clorofila (Padmaja et al. 1989). El selenato y el selenito interfieren con la reducción in vivo del nitrato en hojas. El selenato puede interferir con la síntesis de GSH (glutathiona); lo cual puede disminuir las defensas de la planta contra radicales hidroxilos y el estrés oxidativo (De Kok y Kuiper 1986).

2.5.7 Impacto del selenio en la salud humana

La importancia biológica se puso en evidencia; primero como un tóxico y después como un nutrimento indispensable en la dieta de animales y humanos. Marco Polo describió signos de intoxicación por selenio en los animales de carga en su trayecto por China Occidental en el siglo XIII, ya que se dio cuenta que la ingestión de algunas plantas de la zona les hacía cojear y perder las pezuñas (Oldfield 1995). En seres humanos, fue el padre Pedro Simón en 1560 quien informó sobre pérdida de pelo y uñas en personas que vivían en cierta región de Colombia, la que ahora se sabe tiene un suelo muy rico en selenio (Hanson 1983).

El selenio es de fundamental importancia para la salud humana como un componente de selenoproteínas, que desempeñan funciones estructurales y enzimáticas (Rayman 2002). Entre las más conocidas están la de antioxidante (Combs 2001) y catalizador para la producción de la hormona tiroidea activa (Thomson et al. 2005). Existe evidencia creciente de que la deficiencia de selenio puede causar efectos adversos a la salud y además que su aumento como componente nutricional puede otorgar protección adicional contra las enfermedades (Diplock 1993; Combs 2001). Las selenoproteínas están involucradas en muchos aspectos del metabolismo celular, entre

otros la enzima glutatión peroxidasa (GPX) contiene como componente fundamental al selenio y es esencial para proteger a las células y tejidos del daño autooxidativo debido a la producción de radicales libres (Arthur 2003). Por otra parte, la deficiencia de selenio tiene un efecto adverso sobre la inmunocompetencia, existiendo evidencia de que la suplementación con selenio mejora la respuesta inmune en humanos y que este elemento es un nutriente clave en la lucha contra determinadas infecciones virales como la influenza y VIH-SIDA (Jackson et al. 2004)

La deficiencia de selenio está asociada con estados de ánimo negativos. Igualmente cada vez hay más evidencias de que niveles de ingesta de selenio superiores a 300 µg por persona (Combs 2001) se encuentran asociados con la reducción de riesgo de cáncer (Whanger 2004; Jackson et al. 2004; Rayman 2005; ATSDR 2009), específicamente en el de hígado, próstata, colo-rectal y de pulmón (Rayman 2005), así como la disminución de la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Céspedes y Cabrera 2000), disminución del estrés oxidativo, aumento de la fertilidad y de la función inmune (Broadley et al. 2006).

2.6 Expresión génica

La expresión génica es el proceso por medio del cual todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento. En todos los organismos, inclusive los eucariotas, el contenido del ADN de todas sus células es idéntico. Esto quiere decir que contienen toda la información necesaria para la síntesis de todas las proteínas. Pero no todos los genes se expresan al mismo tiempo ni en todas las células. Hay sólo un grupo de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células y son conocidos como "housekeeping genes". El resto de los genes se expresan o no en los diferentes tipos de células, dependiendo de la función de la célula en un tejido particular. Por ejemplo, genes que codifican proteínas responsables del transporte axonal se expresan en neuronas pero no en linfocitos en donde se expresan genes responsables de la respuesta inmune. También existe especificidad temporal, esto

quiere decir que los diferentes genes en una célula se encienden o se apagan en diferentes momentos de la vida de un organismo. Además, la regulación de los genes varía según las funciones de éstos (Herr 2004).

transmisión de la información genética entre generaciones y la expresión en forma de proteínas de dicha información genética no son suficientes para permitir que el programa de desarrollo de un organismo se lleve a cabo correctamente. Es necesario, además, asegurar que los genes que constituyen la información genética transmitida se expresen en momentos adecuados bien desde el punto de vista cronológico o espacial (procesos de desarrollo) o bien como respuesta a cambios en las condiciones ambientales en las que se encuentra la célula o el individuo. Por otra parte, las respuestas al ambiente o los procesos de desarrollo no suelen producirse como consecuencia de la activación de un único gen en un momento, sitio o condición determinado, sino que suele ser necesaria la expresión coordinada de un conjunto de ellos para que tenga lugar el efecto. Estos dos hechos hacen que el control de la expresión génica sea central en el proceso de la biología molecular de los seres vivos.

2.6.1 Transducción de señal

Los mecanismos que permiten a las células sentir condiciones exteriores (ambientales o señales de desarrollo) y activar como consecuencia de ello la expresión de algunos genes se denominan transducción de señal. En estos sistemas, un complejo de proteínas de membrana recibe la señal externa (ver figura 5). Para ello, este complejo ha de tener una proteína, al menos, dirigida hacia el exterior de la célula de manera que actúe como receptor de la señal. Como consecuencia de la detección de la señal (lo que, en términos bioquímicos suele significar "cuando se ha unido al receptor de membrana la molécula que actúa como inductor") se produce un cambio conformacional en la molécula del receptor; cambio que, a su vez, causa otros en las otras proteínas del complejo de membrana con las que interacciona. Como consecuencia de estos cambios estructurales el complejo de proteínas, por su cara interna, es capaz de modificar químicamente proteínas citoplásmicas activando o inactivando así su función como represores de operones o genes (esto suele ocurrir mediante procesos de fosforilación) o

bien sintetiza moléculas que son inductores que regulan la actividad de represores presentes en la célula (estas moléculas inductoras son lo que se suele denominar colectivamente "segundos mensajeros").

Los sistemas de transducción de señal son muy importantes porque de ellos depende gran parte del control de la expresión génica y porque son manipulables genéticamente, de forma que podemos utilizarlos para disparar procesos de expresión génica usando señales inductoras diferentes de las que normalmente las controlan en la naturaleza pero que son poco manejables en procesos industriales biotecnológicos (Pisabarro 2008).

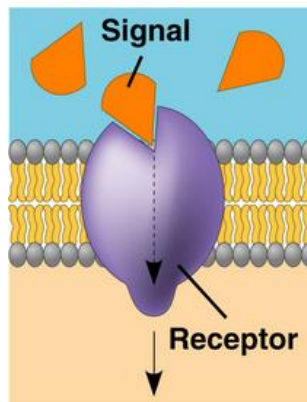


Figura 5. Sistema de transducción de señal

2.6.2 Mecanismo de transcripción

Este es el modo más importante para el control de la expresión de los genes eucariotas y constituye la primera etapa. En este proceso se copia un gen o fragmento de ADN utilizando ribonucleótidos y originándose diferentes tipos de ARN. La localización celular de este proceso en eucariotas es el núcleo. Este mecanismo requiere los siguientes elementos: ADN original de una sola cadena, ribonucleótido trifosfato para llevar a cabo la copia y ARN polimerasa la cual sintetiza el ARN a partir del molde de ADN (Santisteban 1995).

2.6.3 RNA-polimerasa

La transcripción de las diferentes clases de RNAs en eucariotas se lleva a cabo por tres polimerasas diferentes. ARN pol I que sintetiza la rRNAs, a excepción de las especies 5S. ARN pol II que sintetiza los mRNAs y algunos RNAs pequeños nucleares (ARNsn's) que trabajan en el empalme de ARN. ARN pol III que sintetiza los 5S rRNA y el ARNt. El control más complejo observado en eucariotas son los genes que regulan la expresión de ARN pol II que transcriben el ARNm de genes (Hernández et al. 1995).

2.6.4 Estructura de un gen

La mayoría de los genes eucariotas mRNA contienen una estructura básica que consiste en los exones e intrones de codificación y promotores basales de dos tipos (Figura 6). Los promotores basales se denominan cajas CAAT y cajas TATA a causa de su secuencia. La caja TATA reside 20 a 30 bases antes de iniciar la transcripción (Martínez-Frias 2010).

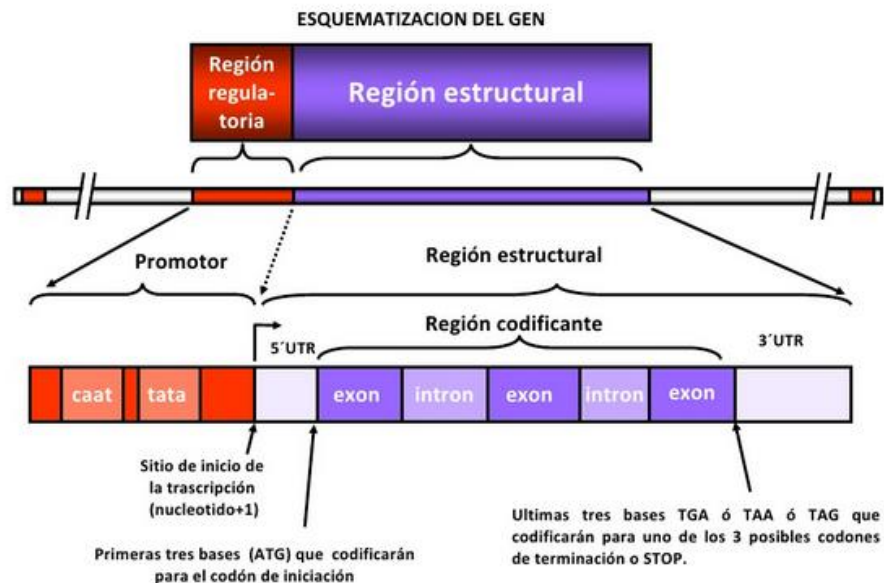


Figura 6. Estructura de un gen eucariota

2.6.5 Proceso transcripcional

En la etapa de iniciación, la ARN-polimerasa se une a una zona del ADN (centro promotor: caja TATA) previa al ADN que se quiere transcribir. A continuación se separan las dos cadenas por la endonucleasa que rompe los enlaces, iniciándose el proceso de copia de ADN a transcribir. Los ribonucleótidos se añaden en sentido 5'-3' (Figura 7). En la elongación la ARN- polimerasa continúa añadiendo ribonucleótidos complementarios al ADN. Se transcriben intrones (no contienen información para la síntesis de cadena polipeptídica) y exones (contienen información para formar la cadena polipeptídica) hasta que se llega a una determinada secuencia que indica a la polimerasa el final de la zona a transcribir. La transcripción finaliza en la terminación, al ARN recién formado se le añade una cola de unos 200 nucleótidos de adenina, la cola de poli-A agregada por la enzima poli-A polimerasa, que sirve para que el ARN no sea destruido por las nucleasas celulares y contribuye a su transporte fuera del núcleo. Se forma así el ARN transcrito primario (pre-ARNm).

2.6.6 Productos de transcripción

La maduración del pre-ARNm consiste en un conjunto de modificaciones en ambos extremos de la molécula, en la eliminación de intrones y en la alteración de ciertas secuencias de ARNm a partir de los cuales se forma el ARN maduro.

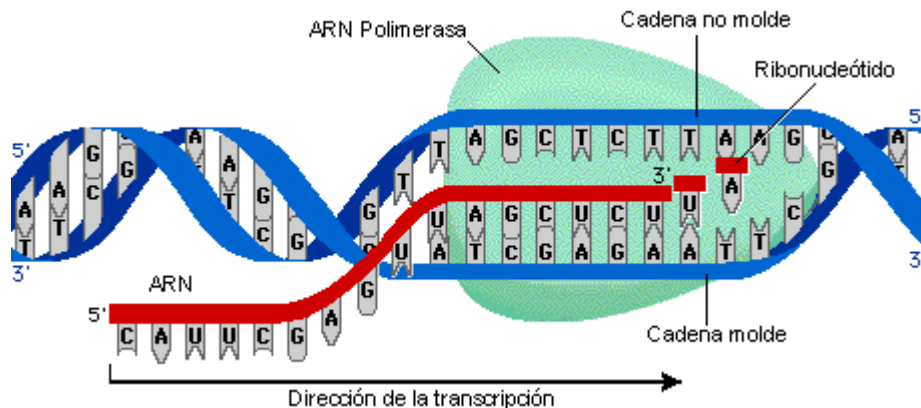


Figura 7. Proceso de transcripción

2.7 Manipulación de los genes involucrados en la asimilación del Se

Reportes previos han estudiado genéticamente la capacidad de las plantas para la acumulación de Se, y ya que este elemento es químicamente similar al azufre (S) y puede ser metabolizado por las vías metabólicas del mismo, varios genes involucrados en la asimilación del S, han sido objetivo de manipulación genética (Pilon-Smits 2005). Inostroza-Blancheteau et al. (2013), determinaron la influencia de la adición de selenito en distintas dosis sobre la expresión de genes de transportadores de sulfato y selenio en dos genotipos de trigo. Entre las funciones del selenio en las plantas se ha reportado que puede aumentar la expresión de los genes relacionados a la fase II de enzimas de detoxificación, ciertas proteínas relacionadas al selenio y genes apoptóticos, mientras disminuye aquellos relacionados a la fase I de activación de enzimas, genes de respuesta al estrés, de funciones de adhesión celular y del citoesqueleto y proliferación celular (Goulet et al. 2007).

Por otro lado, para obtener una mejor idea del efecto del selenio en el metabolismo de las plantas, y los mecanismos involucrados en la tolerancia al selenio, distintos estudios con *Arabidopsis* demostraron que el selenio induce cambios en la expresión génica relacionada con el metabolismo secundario y en general la tolerancia al estrés (Van Hoewyk et al. 2008; Sams et al. 2011) ya que se han identificado los genes de respuesta al selenio. En este estudio las raíces y partes aéreas de la planta exhibieron cambios relacionados al Se en la regulación génica y el metabolismo (Van Hoewyk et al. 2008). Además, los genes involucrados en la asimilación de S fueron sobre expresados, así como la síntesis y señalización de etileno y ácido jasmónico y una variedad de transcriptos inducidos por estrés osmótico y salinidad fueron también aumentados por el selenato en este caso. De igual manera hubo cambios en los niveles de expresión de transcriptos que regulan el crecimiento y el desarrollo de la planta de *Arabidopsis*. Aunque lo anterior ofrece un amplio panorama de expresión de genes relacionados con el metabolismo antioxidante, esto se ofrece en diferentes tejidos de las plantas, pero poco se sabe de la acumulación de Se en frutos.

Aunque es posible incrementar el consumo de especies de cultivos que son genéticamente predispuestas a acumular más Se, la diversificación de la dieta no es siempre factible (Rayman 2002), sin embargo variaciones genéticas dentro de las especies pueden incrementar la demanda del consumo de Se a través de la biofortificación genética (Lyons et al. 2004). En el tomate, especie clasificada como no acumuladora de selenio (White et al. 2004), los estudios realizados hasta el momento se refieren principalmente a los cambios bioquímicos y metabólicos que ocurren al exponer las plantas a este elemento (Schiavon et al. 2013) así como a la generación de transgénicos (Brummell et al. 2011), encontrándose menor información acerca de las respuestas de expresión génica diferencial frente a la aplicación de Se como fertilizante.

Por lo anterior y por el hecho de que la utilización del selenio en fertilizantes para cultivos ya se ha considerado debido a su importancia y a la necesidad de incrementar su consumo a través de los alimentos (Broadley et al. 2006). Es importante revisar la expresión de genes que codifican para la síntesis de antioxidantes específicos, la cual depende de diversos factores y puede ser inducida de manera externa, en este caso por medio de la adición de selenio en el riego del cultivo de la planta de tomate.

2.8 JUSTIFICACIÓN

El selenio es un elemento clasificado como no esencial para la sobrevivencia de las plantas pero es importante para su desarrollo en concentraciones controladas, ya que de lo contrario, a niveles mayores ejerce un efecto pro-oxidante. El uso del selenio en la producción agrícola es una posibilidad que puede derivar en mejoras en la calidad nutricional de los productos y en la tolerancia al estrés en las plantas, ya que induce la generación controlada de radicales libres, lo cual se asocia con ajustes en la expresión génica y modificaciones bioquímicas y fisiológicas que elevan la capacidad de tolerancia de las plantas frente al estrés ambiental, esto puede verse reflejado en productos hortícolas de mejor calidad nutricional. Esta propiedad le confiere beneficios a la salud humana, tales como una mejora del sistema inmunológico, la supresión del cáncer y la reducción de enfermedades cardiovasculares, estas asociadas con el consumo de selenio en la dieta debido a que todas las funciones conocidas del selenio como un nutriente esencial en los humanos y otros animales han sido asociados con las selenoproteínas. Sin embargo, no se dispone de la información básica acerca del efecto del selenio aplicado como selenito sobre los cambios en la expresión génica en los tejidos de la planta de tomate, como inductor del metabolismo antioxidante y en particular sobre antioxidantes específicos de esta especie hortícola la cual posee gran importancia económica; pues además de ser la hortaliza más difundida a nivel mundial por la aceptación general del fruto en la alimentación y su utilización en forma variada, en México se encuentra dentro de las primeras cuatro hortalizas de importancia y su fruto ocupa un primer lugar en la exportación.

2.9 HIPÓTESIS

La aplicación de selenito induce a una mayor producción de frutos en la planta de tomate.

La calidad nutricional del tomate mejora mediante la aplicación de selenito debido a la inducción de cambios en el metabolismo antioxidante de la planta.

El uso de selenito mejora la tolerancia de la planta de tomate frente al estrés ambiental, induciendo a la generación de eliminadores de radicales libres.

2.10 OBJETIVOS

2.10.1 Objetivo General

Generar conocimientos básicos acerca de los cambios en la expresión génica y en la capacidad antioxidante de la planta de tomate al aplicar selenio como selenito de sodio.

2.10.2 Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto del selenio sobre el crecimiento de la planta y la producción de frutos.
- Documentar los cambios inducidos por el selenio en el potencial redox del fruto.
- Medir la acumulación de selenio y de los elementos nutrientes esenciales en el tejido foliar, en tallo y en el fruto de la planta de tomate.
- Cuantificar la acumulación de antioxidantes específicos (actividad catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa así como vitamina C y licopeno).
- Analizar el perfil de expresión génica en el tejido del fruto de tomate maduro en cada tratamiento.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del experimento

El experimento se llevó a cabo en un invernadero del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ubicada en Saltillo, Coahuila, México. El cual se encuentra localizado a una altura de 1743 msnm, entre los 25° 24' de latitud norte y 100° 02' de longitud oeste del meridiano de Greenwich.

3.2 Siembra y acondicionamiento del invernadero

Se sembraron semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) tipo saladette híbrido variedad “Toro” de crecimiento determinado. La siembra se realizó en charolas de poliestireno de 200 cavidades, verificando el crecimiento y el respectivo cuidado de la plántula durante un periodo de 40 días.

Se colocó una malla sombra de polipropileno color negro que tenía un factor de sombra de 25%. Además, en el área se colocaron termómetros y medidores de humedad relativa. La temperatura máxima y mínima y la humedad relativa fueron encontradas oscilando entre 18-25°C y 50-65%, respectivamente.

3.3 Trasplante y establecimiento del cultivo

Se utilizaron 100 macetas de plástico con capacidad de 20 L., mismas que fueron rellenas con sustrato utilizando una mezcla de peat moss y perlita en una proporción 70:30, respectivamente.

Se seleccionaron las plántulas de las más uniformes en tamaño y desarrollo, se sumergió el cepellón en una solución enraizadora y se trasplantaron en las macetas de 20 L. El trasplante se realizó a los 40 días después de la siembra.

La nutrición del cultivo se llevó a cabo mediante la aplicación de la solución nutritiva universal Steiner (Steiner 1961), ajustada a un valor de pH de 5.5 a 6.5 con

ácido sulfúrico, con el objetivo de asegurar la disponibilidad de los elementos minerales en la solución nutritiva y mantener el ión selenito en su forma protonada (Preciado-Rangel et al. 2006). La concentración de la solución aplicada fue acorde a la etapa fenológica: 25% en las etapas iniciales y alcanzando el 75% después de la floración. A las plantas se les aplicaron los siguientes tratamientos como se explica en el Cuadro 1, usando como fuente selenito de sodio anhidro grado reactivo (Na_2SeO_3 Sigma-Aldrich, 99% de pureza).

En las plantas se realizaron podas de yemas laterales y tutoreo de plantas cada 8 días, se llevó un control de plagas y enfermedades mediante aplicaciones preventivas de productos fitosanitarios. Al cabo de 40, 80 y 120 días después del trasplante se registraron para cada fecha la información sobre el tejido foliar, el tallo y el fruto, esto con el fin de poder realizar ciertos análisis morfométricos sobre los componentes de la planta. Las variables evaluadas fueron obtenidas en tres muestreos realizados en las tres fechas mencionadas. Tomando de cada muestreo tejido foliar, de tallo y de fruto para los distintos análisis.

Cuadro 1. Tratamientos aplicados en una solución nutritiva de riego sobre el cultivo de la planta de tomate.

Tratamientos			
T Testigo	Solución Steiner	+	0 mg L⁻¹ de selenio
T 2 mg L⁻¹	Solución Steiner	+	2 mg L⁻¹ de selenio
T 5 mg L⁻¹	Solución Steiner	+	5 mg L⁻¹ de selenio

3.4 Producción de fruto

Para la colecta de los frutos se tomó en cuenta una escala de clasificación de madurez de acuerdo con los estándares estadounidenses de coloración de tomates frescos, seleccionando aquellos denominados “red” (con más del 90% de la superficie de color rojo) según el United States Department of Agriculture (USDA 1997). El total de frutos (NF) fueron aquellos frutos maduros contabilizados en cada planta de 9 elegidas aleatoriamente de cada tratamiento. Se cuantificó el peso de los mismos para obtener la producción de fruto por planta (PF) en g planta⁻¹.

3.5 Variables agronómicas y calidad de frutos

3.5.1 Medición de las variables de crecimiento (Altura y diámetro)

De cada tratamiento, se eligieron 3 plantas completamente al azar y se etiquetaron desde el inicio del trasplante. De cada uno de los tres muestreos correspondientes se realizaron mediciones de la altura de la planta (ALT) desde la base del tallo hasta la última hoja en la parte aérea de la planta con la ayuda de una cinta métrica reportando los valores en centímetros.

De igual forma sobre las plantas elegidas para la medición de altura de la planta, se midió el diámetro del tallo (DT) en la base de la planta. A los frutos colectados se midió el diámetro polar (DP) y ecuatorial (DE) de cada uno utilizando un vernier digital (Autotec, modelo Caliper digital 150 mm) reportando los valores en centímetros. Estos frutos fueron seleccionados en el momento de cada muestreo, se eligieron 3 de los frutos completamente maduros según la denominación “red” por cada planta de cada tratamiento totalizando 9 frutos por tratamiento.

3.5.2 Firmeza de frutos

Se obtuvieron las muestras de los frutos con madurez fisiológica en base a la clasificación “red” evaluando 9 réplicas para cada tratamiento. La firmeza se midió utilizando un penetrómetro manual (QA Supplies, model FT011), se tomó firmemente el fruto y se introdujo el penetrómetro de un solo impulso hasta la marca delimitante de la puntilla de 8mm, se tomó la lectura y se reportó en kg cm⁻¹.

3.5.3 Sólidos solubles totales de frutos

Para los frutos colectados en base a la clasificación "red" se midió la cantidad de sólidos totales (SST). Se perforó cuidadosamente cada fruto para obtener una gota de jugo el cual se colocó en un refractómetro manual (Master Refractometer Automatic Atago) debidamente calibrado, se cerró la tapa suavemente de manera que la muestra cubriera completamente la superficie del prisma, se observó a través de la mirilla y se tomó la lectura en la intersección de los dos campos, los valores se reportaron en grados Brix.

3.5.4 Materia seca total

Para la obtención del porcentaje de materia seca total (MST) se seleccionaron al azar 6 plantas de cada tratamiento para cortar de ellas las dos hojas con madurez fisiológica, tallos y frutos. Se etiquetaron bolsas de papel estrasa (capacidad 1 kg) y se formaron charolas con papel aluminio de igual manera etiquetadas con las muestras a obtener. Las estructuras fueron pesadas para obtener el peso fresco, los tallos fueron cortados en trozos y los frutos en rodajas finas, los tallos y las hojas fueron puestas en bolsas de papel estrasa previamente etiquetadas, por su parte las rodajas de los frutos fueron colocadas en charolas de papel aluminio, colocando después todas las estructuras en una estufa de secado a una temperatura de 60°C durante 48 horas. Transcurrido el tiempo se pesaron nuevamente únicamente las estructuras restando el valor del peso de las bolsas y charolas que los contenían y se calculó el porcentaje de materia seca total.

3.6 Contenido de selenio y macronutrientes

3.6.1 Cuantificación de selenio, potasio, magnesio y calcio

De las muestras obtenidas para la estimación de materia seca total, se tomó una porción de 5 g y se maceró en un mortero de porcelana. Se tomó 1 g del macerado y esta muestra fue sometida a digestión ácida con ácido nítrico y perclórico en una proporción 3:1 usando una plancha de calentamiento a 100 °C. Posteriormente la solución fue filtrada con papel filtro Whatman (No 42 sin cenizas) y aforada a una solución de trabajo de 100 mL con agua desionizada. La lectura se realizó utilizando un espectrómetro de

Inducción de Plasma (ICP) marca THERMO JARELL ASH, Modelo IRIS Advantage, siguiendo el procedimiento 984.27 de la AOAC (2000). Los nutrientes cuantificados fueron K, Mg y Ca además de la correspondiente cuantificación de selenio.

3.6.2 Cuantificación de nitrógeno

El nitrógeno fue cuantificado por el método de Kjeldahl (AOAC 1980). Para realizar esta prueba se desarrolló lo siguiente:

Digestión: Se pesaron 0.05 mg de fruto seco, previamente macerado en un matraz bola cuidando que la muestra no se pegara a las paredes del matraz, posteriormente se añadieron 4 mL de la mezcla digestora y se sometió la muestra a una digestión en el aparato de micro destilador Kjeldahl bajo una campana de extracción, la digestión se terminaba al tornarse la muestra en un color azul-verde claro.

Destilación: Se prendió el micro destilador, ajustando la velocidad de destilación a 5 mL por minuto, al mismo tiempo que se abre la llave de agua para tener H₂O circulando por el refrigerante. Se agregó la muestra a la cámara de ebullición por medio de un embudo, colocando un frasco Erlenmeyer con 30 mL de ácido bórico y dos gotas de indicador bajo la salida de destilación, se añadieron 10 mL de la solución de NaOH a la cámara de ebullición lentamente. La prueba exige recuperar 60 mL de destilado lista para titular.

Titulación: El destilado se tituló con H₂SO₄ (0.025 N) finalizando hasta que la muestra se tornara en un color violeta, comparando cada muestra con el blanco de la prueba. Se finalizó con los cálculos; cada equivalente del H₂SO₄ usado corresponde a un equivalente de NH₃ o a un equivalente de N en la muestra original. El peso del N en mg está dado por miliequivalentes del ácido x 14 (el peso equivalente del N).

3.6.3 Cuantificación de fósforo

El fósforo se cuantificó por el método colorimétrico del reactivo ácido aminonaftol sulfónico ANSA (Harris y Popat 1954). Se utilizaron las digestiones elaboradas previamente para la cuantificación de los minerales (K, Ca, Mg, Fe, Zn). Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL con una micro pipeta de la solución de ceniza que contenía 0.01–0.2 mg de fósforo mL^{-1} , se añadieron 5 mL de molibdato de amonio, y 2 mL de ANSA, se mezcló para combinar todos los reactivos.

La lectura se realizó en un espectrofotómetro UV-visible (Genesys 10S Thermo Scientific), después de 20 minutos, a una longitud de onda de 640 nm. Con el dato obtenido se buscó la concentración parcial de fósforo por medio de la curva estándar y se ajustó este valor con la cantidad de muestra que se pesó.

3.7 Cuantificación de antioxidantes proteicos

3.7.1 Potencial de óxido-reducción (ORP)

La tendencia a reducir u oxidar a otros elementos químicos se cuantifica por el potencial de reducción, también llamado potencial redox. Para realizar esta prueba se recolectaron los frutos con madurez fisiológica en base a la clasificación “red” evaluando 6 réplicas por cada tratamiento, se pesaron las muestras en una balanza analítica (Ohaus, modelo PA214), en seguida se preparó la solución Buffer de Fosfatos (Fosfatos 0,1 M, pH 7) que consta de dos soluciones; 1) Solución A (NaH_2PO_4 0,2 M): se disolvieron 27.6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, llevando el volumen final a 1 litro. 2) Solución B (Na_2HPO_4 0,2 M): se disolvieron 53.65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, llevando el volumen final a 1 litro. Tomándose 195 mL de la solución A, 305 mL de la solución B y 500 mL de agua destilada. Posteriormente se colocó la muestra en un mortero, agregándole 10mL de buffer de fosfatos preparado para macerar el fruto obteniendo un concentrado o jugo, se llevó la muestra al lector ORP (pH/ORP/ISE Meter, Hanna) donde se colocó el electrodo en el concentrado esperando a que la medición se estabilizara, se reportaron las lecturas en mV, se lavó el electrodo con agua desionizada y se secó repitiendo la operación para todas las muestras de cada tratamiento.

3.7.2 Cuantificación de proteínas totales

Para la preparación de los extractos de hojas, tallos y frutos en cada muestreo se maceró 1 g de tejido fresco en un mortero con nitrógeno líquido, de este macerado se tomaron 0.3 g y se transfirieron a un tubo para microcentrífuga eppendorf de 2.0 mL y se agregó 1.5 mL de buffer de fosfatos pH 7 almacenada previamente a 4°C. El tubo con la muestra fue sujeta a un vortex (Genie 1 Touch mixer model SI-0136) con el fin de homogenizar la muestra, se sonicó (Sonicador Branson 1510 model 1510R-DTH) sobre hielo por 10 minutos, posteriormente se centrifugó en frío (Prism Labnet International Inc.) a 12000 rpm por 10 minutos a 2°C. El sobrenadante fue separado y mantenido a -80°C.

Las proteínas totales fueron cuantificadas para determinar la actividad enzimática relativa al total. Se obtuvo una curva estándar (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700 ppm) de una solución del albúmina sérica bovina y se usó un blanco con buffer de fosfatos de pH 7. Para llevar a cabo dicha cuantificación se utilizó el mismo extracto antes mencionado del cual se tomaron 5 µL y junto con 250 µL del reactivo de Bradford (Bradford, 1976) se colocaron en cada uno de los pozos correspondientes en una multiplaca de ELISA, la lectura se realizó en un lector de multiplacas (BioTek ELx808 Absorbance Microplate Readers) a una absorbancia de 630 nm.

3.7.3 Actividad específica catalasa

Se analizó la actividad Catalasa de acuerdo al protocolo modificado de Lubinsky y Bewley (1979) por medio de espectrofotometría UV-visible a una longitud de onda de 275 nm. De los extractos de tejido vegetal se tomó una cantidad de 20 µL y se hizo una dilución 1:20 con 380 µL de buffer de fosfatos pH 7. Se preparó un blanco, con 400 µL de buffer de fosfatos pH 7, 150 µL de H₂SO₄ (2%) y 2 µL de H₂O₂ (30%). Se determinó un tiempo 0 con la muestra diluida 1:20, 150 µL de H₂SO₄ (2%) y 2 µL de H₂O₂ (30%), este es llamado tiempo 0 porque la posible reacción a iniciar fue detenida previamente con el H₂SO₄ y finalmente un tiempo 1 con la muestra diluida 1:20, 2 µL de H₂O₂ (30%) y dejándolo reaccionar durante 1 min con agitación vigorosa más 150 µL de H₂SO₄ (2%) para detener la reacción. Esto se hizo para cada muestra. Las absorbancias fueron medidas a una longitud de 275 nm y fueron hechas en una celdilla de cuarzo (10x10mm)

en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis). Se realizó una curva estándar de H_2O_2 como referencias (0, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 100 mM). Una Unidad de catalasa se define como $1 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

3.7.4 Actividad específica glutatión peroxidasa

La actividad de la enzima Glutatión Peroxidasa se cuantificó por el método de Xue et al. (2001) modificado. Se usó el mismo extracto de tejido vegetal utilizado para las anteriores cuantificaciones. Del sobrenadante se tomó una cantidad de 0.2 mL y se colocó en un tubo eppendorf 1.5 mL, se adicionaron 0.4 mL de GSH (0.1 mM) y 0.2 mL de buffer de sodio y potasio (0.067 M). Después de pre-calentamiento de las mezclas en baño de agua a 25°C durante 5 min, se añadieron 0.2 mL de H_2O_2 (1.3 mM) para iniciar la reacción. La reacción se mantuvo 10 minutos y fue detenida añadiendo 1 mL 1% de ácido tricloro acético, la mezcla se colocó en baño de hielo por 30 min y enseguida fue centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. Se tomaron 0.48 mL del sobrenadante y se colocaron dentro de una cubeta adicionando 2.2 mL Na_2HPO_4 (0.32 M) y 0.32 mL de 1.0 mM 5,5-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) con 5 minutos de reposo para el desarrollo del color. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 10S). Se obtuvo una curva estándar (0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.3 y 62.5 mU mL^{-1}) con la enzima pura obtenida comercialmente del kit Glutathione Peroxidase (GPx, Assay Science Cell Research Laboratories). Una Unidad de glutatión peroxidasa se define como $1 \text{ mU de GSH-Px mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

3.7.5 Actividad específica superóxido dismutasa

Esta medición fue llevada a cabo con ayuda de un Kit SOD (SOD assay kit Sigma- Aldrich 19160). Se construyó una curva estándar como lo indica el kit SOD y se calculó la actividad enzimática con el porcentaje de la tasa de inhibición incubando las mezclas a 37°C durante 20 min y leyendo las absorbancias a 450 nm en un lector de microplacas para ELISA (BioTek ELx808 Absorbance Microplate Readers). De acuerdo con la metodología del kit SOD, se realizaron tres blancos: a) blanco 1= ddH_2O (double distilled water), WST (working solution) y la dilución de la enzima, b) blanco 2=

extracto, WST y la dilución buffer y finalmente el blanco 3= ddH₂O, WST y la dilución buffer que contiene el kit. Una Unidad de superóxido dismutasa se define como el 50% de inhibición de formazán a 450 nm.

3.8. Cuantificación de antioxidantes no proteicos

3.8.1 Ácido ascórbico

De acuerdo al método AOAC (1990), se pesaron 10 g de las muestras de frutos frescos, se trituraron y se depositaron en un mortero de porcelana, posteriormente se añadieron 10 mL de ácido clorhídrico al 2% y se maceró por 10 minutos, el contenido fue lavado tres veces con agua destilada por medio de filtración, el líquido filtrado se depositó en un matraz volumétrico de capacidad de 100 mL. Por su parte, el sólido restante fue lavado nuevamente con agua destilada y trasladado al mismo matraz volumétrico de 100 mL para su subsecuente aforación. Se midieron 10 mL del extracto obtenido de la aforación previa y se depositaron en un matraz erlenmeyer de 125 mL, se tituló con una solución de 2,6 diclorofenolindofenol (0.001N), hasta que apareció el primer tono rosa que persistió 30 segundos. Se utilizó un blanco de agua destilada.

3.8.2 Licopeno

El licopeno se cuantificó usando una modificación del método de Bunghez et al. (2011). La cuantificación se llevó a cabo con 3 réplicas por tratamiento. Se obtuvo una selección de frutos frescos maduros, se cortaron en rodajas para luego ser colocados en charolas de aluminio y llevados a secado en una estufa de deshidratación (Lindberg/Blue M, model Gravity Oven) a una temperatura de 60°C durante 48 horas. El tejido deshidratado fue pulverizado en un mortero, de este polvo se tomó una porción de 0.5 g y se mezcló con 0.5 mL de buffer de fosfatos (pH 7) y 2 mL de una mezcla extractora compuesta por hexano: acetona en una relación 2:3. El extracto obtenido se llevó a centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos y se obtuvieron 2 fases. La fase orgánica se diluyó con acetona en un volumen 1:1 y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 502 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis). Se realizó una curva estándar de licopeno (Lycopene 96% Xian Lukee Bio-Tech Co., Ltd.)

con 0, 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75 mg L⁻¹ a partir de una solución madre de 100 mg L⁻¹. La cual consistió en un estándar de licopeno y una mezcla extractora hexano: acetona (2:3).

3.9 Análisis de la expresión génica de frutos

3.9.1 Extracción y cuantificación de ARN.

La extracción de ARN se llevó a cabo por el método del Trizol (TRI reagent, Sigma-Aldrich 93289). Se utilizaron 100 mg de tejido de frutos frescos y se maceraron con nitrógeno líquido, se agregó 1 mL de Trizol y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µL de cloroformo y se agitaron vigorosamente, la mezcla posteriormente se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 gravedades a 4°C durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 500 µL de isopropanol frío y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 g a 4°C durante 10 minutos. La pastilla resultante se lavó con 500 µL de etanol frío (70%), se centrifugó por 5 min a 7,500 g y 4°C, nuevamente, el sobrenadante fue removido y la pastilla restante en el fondo del tubo fue secada al aire durante 5 min. La pastilla se resuspendió con 50 µL de agua DEPC y posteriormente incubada en baño de agua de 60°C durante 15 min para disolver el ARN. Finalmente, para que el ARN pudiera ser almacenado en condiciones de estabilidad, se alicuotó en 3 tubos de 500 µL, conteniendo 20 µL en cada uno de ellos, entonces se almacenó a -70°C. Se determinó la cantidad del ARN obtenido por medio de espectrofotometría UV-Vis (absorbancia 260/280) y la calidad por electroforesis desnaturalizante.

3.9.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis del ADNc se llevó a cabo a partir de los extractos de ARN mediante el uso del Kit comercial ImProm II Reverse transcription sysem (Promega, A3800). Esta

síntesis fue llevada a cabo por medio de 2 reacciones: En la primera se agregó 1 μL de Random primer a un tubo conteniendo 2 μg de ARN. Se usó un control negativo conteniendo agua DEPC y un control positivo conteniendo Kanamycina. Todos los tubos fueron calentados a 70°C por 5 minutos y enfriados a 4°C por 5 min y fueron centrifugados por 10 segundos. En la segunda reacción se hizo una mezcla conteniendo agua libre de nucleasas, Buffer 5X, MgCl_2 , mezcla de dNTP's, inhibidor de ribonucleasas y transcriptasa reversa. De este mix se tomaron 15 μL y se agregaron 5 μL de ARN de la primera reacción. Para la amplificación de los genes se utilizó la PCR mediante el uso de un termociclador (Labnet, multigene gradient), una vez terminado el ciclo ($25^{\circ}\text{C}/5$ min, $42^{\circ}\text{C}/60$ min, $70^{\circ}\text{C}/15$ min, $4^{\circ}\text{C}/\text{indefinido}$) se almacenaron a -20°C .

3.9.3 RT- PCR semicuantitativa

Los iniciadores fueron diseñados con el programa Primer-BLAST y sintetizados por Macrogen Inc. (Seoul, Korea, <http://www.macrogen.com>), de esta manera fueron obtenidos comercialmente. Las características de los iniciadores empleados se muestran en el (Cuadro 2). Se utilizó un termociclador programable (Labnet, multigene gradient). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis usando un gel de agarosa al 3%. Las imágenes del gel fueron capturadas con un sistema de imágenes (MultiDoc-It Digital Imaging System, UVP).

3.9.4 Densidad relativa

Las bandas obtenidas se analizaron por densitometría de imagen mediante el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). En éste, se colocaron las imágenes de los geles y se seleccionó el área de la banda obtenida, se obtuvo el área bajo la curva obteniéndola en valores numéricos y posteriormente fue convertida en porcentaje. El mismo procedimiento se realizó para cada uno de los genes incluyendo un gen endógeno previamente seleccionado por medio de un screening, eligiendo gliceraldehído 3 fosfato (g3f) para hojas y frutos y actina para los tallos. De éste, se obtuvieron valores numéricos de densidad ajustada de los genes endógenos y de densidad relativa para cada uno de los genes de estudio, siendo el valor de 1 para el tratamiento testigo (0 mg mL^{-1}),

cambios mayores a este nivel de transcripción fueron considerados significativos o sobre expresados.

Cuadro 2. Características de los iniciadores utilizados para la cuantificación de la expresión génica.

Nombre del iniciador	Secuencias	Temperatura de anillamiento	Tamaño de producto de amplificación
<i>cat-f</i>	5'- GGC CTG TTC TGC TTG AGG AT-3'	60°C	170 pb
<i>cat-r</i>	5'- GCC AGG AGC TCG GAG AAA AT-3'	60°C	170 pb
<i>gpx-f</i>	5'- AGG ATG CTA AGG GCA AGG AC-3'	58°C	169 pb
<i>gpx-r</i>	5'- TTG CAA GGG AGG GCC AGA AT-3'	58°C	169 pb
<i>sod-f</i>	5'- TGA TGA TGG GCC AAC TAC GG-3'	59°C	175 pb
<i>sod-r</i>	5'- ACC CGC ATG ACG GAT TTC AT-3'	59°C	175 pb
<i>apx-f</i>	5'- TCT CCT CTC CTT CCC CAC AT-3'	60°C	161 pb
<i>apx-r</i>	5'- GTG GCC TTC AAC AGC TCC TT-3'	60°C	161 pb
<i>lic-f</i>	5'- ACC CTG TTG GAA AAA GAT GGA T-3'	58°C	151 pb
<i>lic-r</i>	5'- ACC CAA AGT TTC ACA AAA CTT CCT-3'	58°C	151 pb
<i>g3f-f</i>	5'- GGA GTC GAC CGG TGT TTT CA-3'	60°C	190 pb
<i>g3f-r</i>	5'- GGG AGC AAG GCA ATT TGT GG-3'	60°C	190 pb

3.10 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 30 repeticiones por tratamiento. Para las variables agronómicas (producción de frutos, altura de la planta, diámetros de tallos y materia seca total), así mismo como para las variables de calidad (acumulación de selenio, macronutrientes, firmeza y sólidos solubles de frutos) y antioxidantes específicos (CAT, SOD, GPX, ácido ascórbico y licopeno). Se realizó un análisis de varianza con el software Statistical Analysis System (SAS 9.1.3), esto con el fin de verificar si los tratamientos de selenito proporcionaron diferencias significativas a cada una de las variables. Se desarrolló una prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) para identificar diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos, las pruebas de medias fueron independientes para cada órgano de la planta. Adicionalmente se aplicaron dos pruebas de correlaciones por rango (r de Spearman), una para verificar

la asociación estadística entre las concentraciones de elementos minerales en hojas, tallos y frutos y otra prueba para verificar la asociación entre las variables agronómicas medidas, las variables bioquímicas y los datos de expresión génica. Para los datos de densidad relativa de expresión génica se aplicó una prueba de comparación de medias no paramétrica de Fisher ($p \leq 0.1$) usando el software Statistica (versión 6.0).

IV. RESULTADOS

4.1 Producción del fruto

Aunque el número de frutos (NF) y peso de frutos (PF) por planta no fueron modificados estadísticamente por los tratamientos de Se (Cuadro 3), se encontró una correlación de Spearman positiva entre la variable NF y la concentración de Se ($R = 0.9637$, $\alpha \leq 0.05$). Además los resultados muestran un aumento gradual en el rendimiento del fruto bajo la aplicación de tratamientos con selenio en comparación con el testigo, que van desde 12 frutos hasta casi 17 frutos por cada planta analizada (tratamiento testigo y tratamiento 5 mg L^{-1} respectivamente). Tomando en cuenta que los frutos cuantificados fueron solamente aquellos restantes ya que se llevaron a cabo podas de las yemas laterales cada 15 días. Este efecto de aumento puede ser observado a pesar de que no se detectó una diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0.05$) entre el testigo y los tratamientos. De la misma manera sucedió en la producción de fruto, medida en gramos por planta, que va desde 869 a 1184 g por planta.

Cuadro 3. Números de fruto por planta (NF) y peso de frutos por planta (PF) en tomate con aplicación de tres tratamientos de selenio (0, 2 y 5 mg L^{-1}) en la solución nutritiva.

Tratamientos	NF (Frutos planta ⁻¹)	PF (g planta ⁻¹)
0 mg L^{-1}	12.00±2.9a	869.20±224.6a
2 mg L^{-1}	17.67±3.9a	1061.53±349.8a
5 mg L^{-1}	16.67±3.6a	1184.83±378.9a

NF: fruto por planta; PF: peso de fruto por planta; ddt: días después del trasplante. Las medias seguidas de la misma literal no son diferentes según Tukey ($p \leq 0.05$).

4.2 Cuantificación de variables agronómicas y de calidad de frutos

Los resultados de las variables agronómicas se muestran en el Cuadro 4. Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos asociados a la aplicación de Se en comparación con el tratamiento testigo, con un incremento significativo en los valores de longitud de tallo (ALT), diámetro de tallo (DT), sólidos solubles totales de fruto (SST), firmeza y diámetro de frutos (DP y DE). Con respecto al

contenido de materia seca total (MST), también hubo una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre tratamientos en hojas pero no en tallos y frutos (Cuadro 5).

Cuadro 4. Comparación de medias de las variables agronómicas y calidad de frutos evaluadas en tres fechas de muestreo en plantas de tomate con aplicaciones de selenio en solución nutritiva a tres diferentes concentraciones: 0, 2 y 5 mg L⁻¹.

Tratamientos	ALT cm	DT mm	DP cm	DE cm	Firmeza kg cm ⁻²	SST °Bx
Control	61.1±3.9b*	11.8±0.9b	5.49±0.7b	5.42±0.5b	2.9±0.2c	4.3±0.1b
2 mg L ⁻¹	67.5±3.0a	13.4±0.8a	6.24±0.5a	5.93±0.3a	4.3±0.3b	5.1±0.4a
5 mg L ⁻¹	65.2±2.9a	13.3±0.8a	6.38±0.4a	5.96±0.7a	4.5±0.3a	4.9±0.6a

*Las medias seguidas de la misma literal no son diferentes según Tukey ($p \leq 0.05$). ALT = altura de planta; DT = diámetro de tallo; DP = diámetro polar diámetro de fruto; DE= diámetro ecuatorial de fruto; SST = sólidos solubles totales.

Cuadro 5. Comparación de medias de la material seca total (MST) evaluada en plantas de tomate con aplicaciones de selenio en solución nutritiva a tres diferentes concentraciones: 0, 2 and 5 mg L⁻¹.

Tratamientos	MST (%)		
	Hoja	Tallo	Fruto
Control	43.7±14.5 b*	26.6±3.0 a	32.8±6.1 a
2 mg L ⁻¹	48.1±19.1 ab	28.3±3.6 a	28.9±4.5 a
5 mg L ⁻¹	50.9±19.2 a	29.9±6.5 a	30.0±4.9 a

* Las medias seguidas de la misma literal no son diferentes según Tukey ($p \leq 0.05$).

4.3 Contenido de selenio y macronutrientes

4.3.1 Cuantificación de selenio

La concentración de Se en los diferentes componentes de la planta analizando hojas, tallos y frutos y expresada en $\mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 8), indicó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos; sin embargo, en los frutos, la única diferencia fue entre el tratamiento 5 mg L^{-1} de Se con un valor de $35.8 \mu\text{g g}^{-1}$ en comparación con el control. Referente a la distribución de Se en las plantas, se obtuvo más selenio en los tallos y menor concentración en los frutos y hojas (Figura 8).

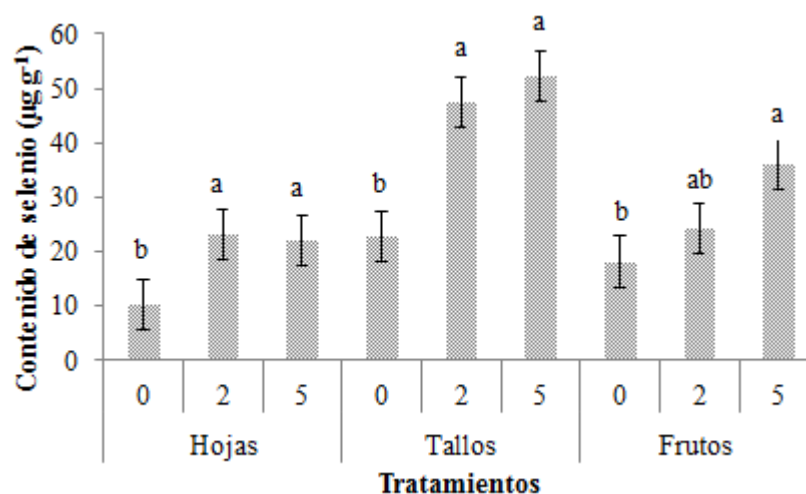


Figura 8. Concentración de selenio en hojas, tallos y frutos de tomate con aplicaciones de selenio en solución nutritiva; las concentraciones usadas se indican en el eje x (0, 2 y 5 mg L^{-1}). Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$), esto se aplicó independientemente para cada órgano de la planta.

4.3.2 Cuantificación de macronutrientes

La concentración de elementos macronutrientes en los tejidos de las plantas es mostrada en el Cuadro 6. Los contenidos de macronutrientes que mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos fueron el contenido de Mg en hojas como el K en tallos y frutos. A pesar de estos resultados, el coeficiente de Spearman (Mg hojas, $r = -0.08$; K tallos, $r = -0.33$; K frutos, $r = -0.24$) no mostró correlación significativa ($p \leq 0.05$)

entre la concentración de Se y el resto de los elementos minerales. Este hecho sugiere que la presencia de Se en la concentración usada en este estudio no interfirió con la absorción de otros elementos.

Las correlaciones entre la concentración de Se en los diferentes tejidos de la planta, fueron todas significativas (hoja/tallo, $r=0.50$; hoja/fruto, $r=0.68$; tallo/fruto, $r=0.59$), lo que sugiere una ausencia de competencia por el Se entre los diferentes órganos y una acumulación de Se de los órganos en proporción directa a su disponibilidad

Cuadro 6. Concentración de macronutrientes y selenio en los diferentes órganos de la planta de tomate con aplicaciones de selenio en solución nutritiva a tres diferentes concentraciones 0, 2 y 5 mg L⁻¹.

Órganos							
de la	Se						
planta	(mg L⁻¹)	N	P	K	Ca	Mg	Se
Hojas	0	3.36±0.66a*	0.76±0.27a	3.57±0.23a	5.16±2.76a	0.58±0.19c	9.90±0.10b
	2	3.24±0.46a	0.82±0.18a	4.42±1.94a	4.72±1.43a	0.68±0.16b	20.9±0.12a
	5	3.09±0.48a	0.91±0.34a	3.47±0.85a	3.54±1.50a	0.71±0.34a	20.4±0.13a
Tallos	0	2.36±0.59a	0.70±0.10a	3.84±0.20ab	3.30±1.68a	0.49±0.16a	21.7±0.12b
	2	2.50±0.50a	0.77±0.19a	4.47±1.47a	3.90±1.64a	0.31±0.06a	45.6±0.15a
	5	2.49±0.41a	0.72±0.11a	3.40±0.67b	2.82±2.16a	0.37±0.06a	52.3±0.31a
Frutos	0	2.20±0.42a	0.59±0.03a	2.95±0.56ab	0.86±0.3a	0.40±0.13a	16.8±0.05b
	2	1.87±0.34a	0.47±0.04a	3.44±0.46a	1.26±1.3a	0.34±0.13a	24.5±0.10ab
	5	2.11±0.45a	0.56±0.15a	2.90±0.55b	2.82±0.03a	0.33±0.15a	35.8±0.14a

*Medias con la misma letra en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$).

Las concentraciones de N, P, K, Ca y Mg están dadas en porcentaje, el selenio en µg g⁻¹.

4.4 Potencial de óxido-reducción de los frutos

La variable potencial de óxido reducción (ORP) mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos. En los frutos donde se aplicó selenito de sodio (Na_2SeO_3) a 2 mg L^{-1} y 5 mg L^{-1} se encontró un efecto benéfico para esta variable (Figura 9), es decir que disminuyó el valor por tanto aumentó su potencial de óxido-reducción.

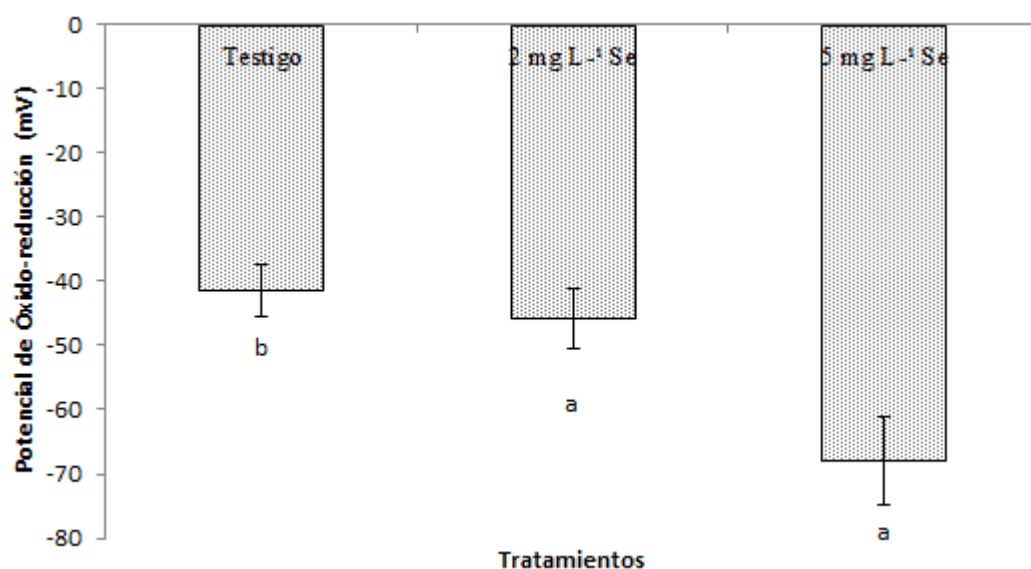


Figura 9. Potencial de oxido reducción bajo tres tratamientos de selenio (0, 2 y 5 mg L^{-1}). Medias con letras iguales no son estadísticamente significativas ($p > 0.05$) según la prueba de Tukey. mV= milivolts

4.5 Antioxidantes protéicos

4.5.1 Proteínas totales

La cantidad de proteínas totales en los extractos de los diferentes tejidos de la planta de tomate se observan en la Figura 10. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos con aplicaciones de selenio y el testigo. La cuantificación de las proteínas totales en los extractos de los tejidos

de la planta proporcionaron una medida relativa de la cantidad de proteínas específicas debido a que la actividad específica de una proteína es equivalente al número de unidades de esa proteína específica sobre los miligramos de proteínas totales. Así, la medición de la actividad específica de cada enzima fue utilizada como una medida relativa al total de proteínas.

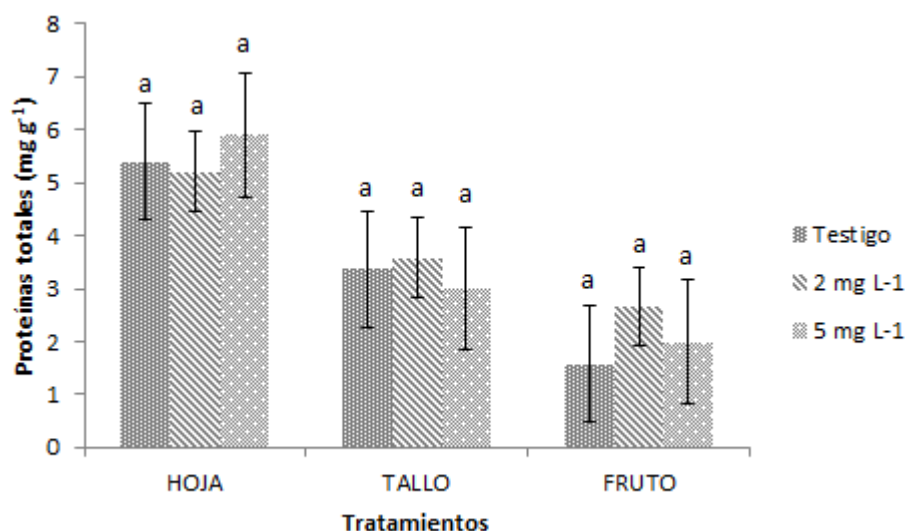


Figura 10. Cantidad de proteínas totales en hojas, tallos y frutos de tomate con aplicaciones de 0, 2 y 5 mg L⁻¹ de selenio. Medias con las mismas literales son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$), esta fue aplicada independientemente para cada órgano de la planta. Líneas verticales indican desviación estándar.

4.5.2 Actividad enzimática

La actividad específica de la enzima catalasa mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) aplicando 5 mg L⁻¹ de Se únicamente en los frutos (Figura 11) mientras que la actividad reportada para las hojas y tallos no se mostró estadísticamente significativa ($p > 0.05$). De manera totalmente similar a la catalasa, la actividad glutatión peroxidasa mostró un aumento significativo ($p > 0.05$) con el tratamiento 5 mg L⁻¹ en los frutos pero no así para hojas ni tallos (Figura 12). Mientras tanto, la actividad específica de la enzima superóxido dismutasa se encontró similar para hojas y tallos aunque en frutos

aumentó significativamente con ambos tratamientos de aplicación de Se (2 y 5 mg L⁻¹) (Figura 13).

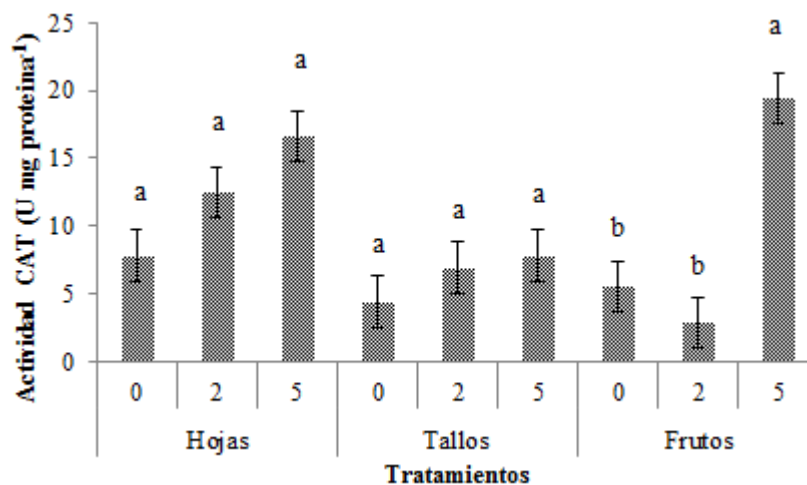


Figura 11. Actividad específica catalasa en hojas, tallos y frutos de tomate con aplicaciones de 0, 2 y 5 mg L⁻¹ de selenio. Medias con las mismas literales son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$), ésta fue aplicada independientemente para cada órgano de la planta. Líneas verticales indican desviación estándar.

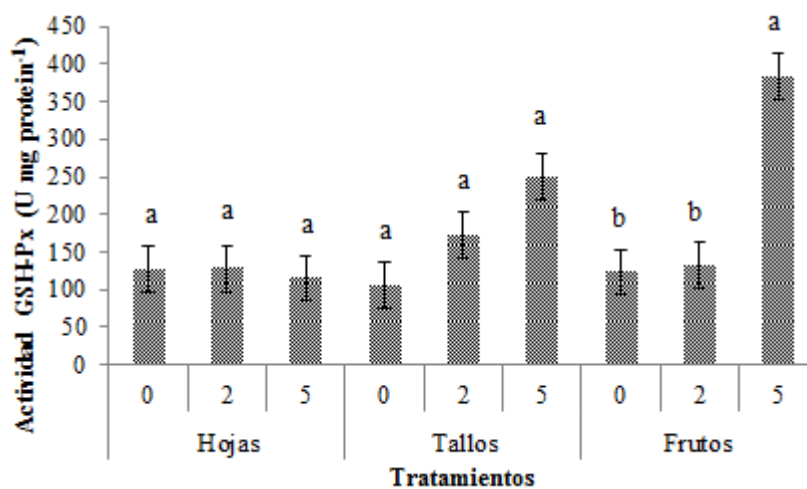


Figura 12. Actividad específica glutatión peroxidasa en hojas, tallos y frutos de tomate con aplicaciones de 0, 2 y 5 mg L⁻¹ de selenio. Medias con las mismas letras son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$), ésta fue aplicada independientemente para cada órgano de la planta. Líneas verticales indican desviación estándar.

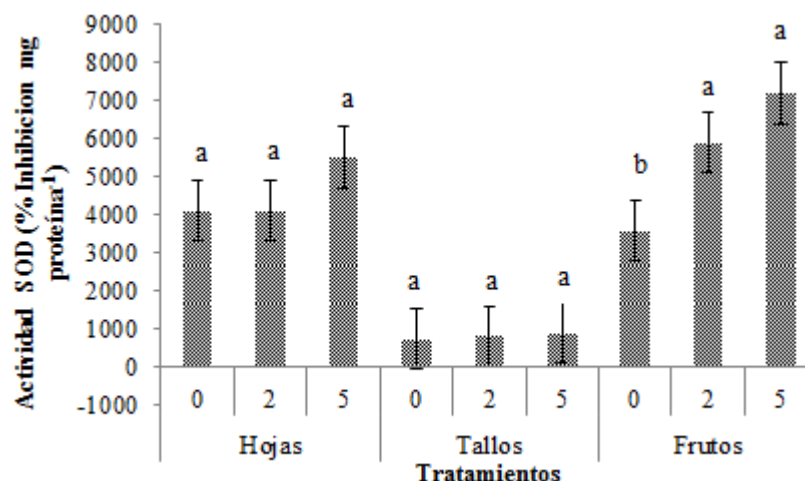


Figura 13. Actividad específica superóxido dismutasa en hojas, tallos y frutos de tomate con aplicaciones de 0, 2 y 5 mg L⁻¹ de selenio. Medias con las mismas letras son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.05$), ésta fue aplicada independientemente para cada órgano de la planta. Líneas verticales indican desviación estándar.

4.6 Antioxidantes no protéicos

4.6.1. Ácido ascórbico y licopeno

En los frutos se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la variable AA además del aumento en los SST anteriormente señalado. Estos cambios positivos en la calidad se vieron acompañados por un aumento en la concentración de licopeno al aplicar 5 mg L⁻¹ de Se (Cuadro 7).

Cuadro 7. Características químicas de los frutos de tomate de plantas con aplicación de selenio (0, 2 y 5 mg L⁻¹) en la solución nutritiva. Los datos corresponden a frutos colectados a los 120 ddt.

Tratamientos	Ácido	
	ascórbico (mg AA 10g ⁻¹)	Licopeno (μg g ⁻¹)
0 mg L ⁻¹	1.20±0.20b	13.81±2.4b
2 mg L ⁻¹	2.82±0.09a	20.34±5.1b
5 mg L ⁻¹	2.41±0.10a	41.71±6.2a

Las medias seguidas de la misma literal no son diferentes según Tukey ($p > 0.05$). AA= ácido ascórbico; ddt = días después del trasplante.

4.7 Expresión génica en los frutos

Los valores de densidad relativa de los frutos mayores a 1, los cuales se encuentran sobre-expresados se anotan en la Figura 14. Este fue el caso de *gpx*, *sod* y *apx* con la aplicación de 2 mg L⁻¹ de Se, caso contrario sucedió con la mayoría de los genes con 5 mg L⁻¹ de Se los cuales se encontraron con valores por debajo de 1, es decir con un nivel de expresión menor. La excepción fue el gen *gpx* que mostró aumento en su expresión con la mayor concentración de Se. Cabe señalar que se encontró una correlación de Spearman significativa ($R = 0.9636$, $\alpha \leq 0.05$) de la expresión del gen *cat* con respecto a la concentración de Se.

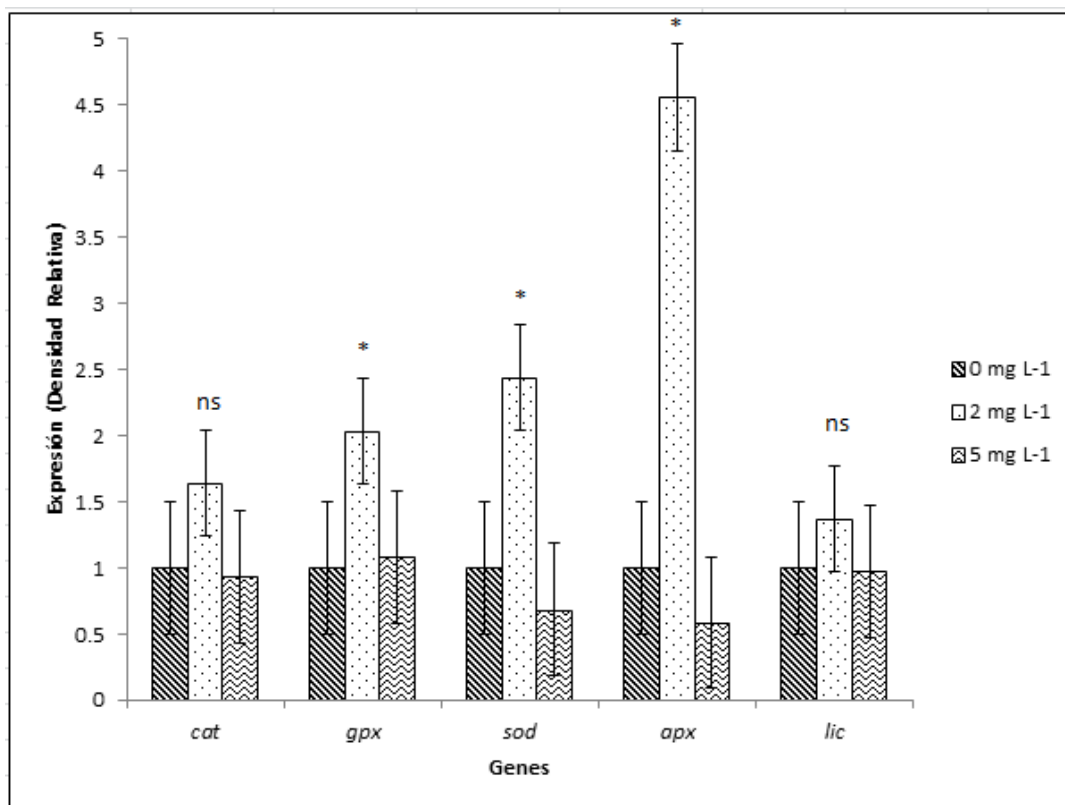


Figura 14. Nivel de expresión de genes de antioxidantes de frutos de tomate de plantas con aplicación de selenio (2 y 5 mg L⁻¹) y un tratamiento testigo (0 mg L⁻¹) en la solución nutritiva. Los valores mostrados indican la expresión relativa frente al testigo con un valor de 1. *cat* : gen catalasa; *gpx*: gen glutatión peroxidasa; *sod*: gen superóxido dismutasa; *apx*: gen ascorbato peroxidasa y *lic*: gen licopeno. ns= no significativo * Significativo ($p < 0.05$).

V. DISCUSIÓN

5.1 Producción de fruto

Los resultados de producción de fruto no concuerdan con algunos reportes previos. Existen reportes sobre efectos positivos de la adición de selenio en cultivos hortícolas (Germ et al. 2005), sin embargo, el efecto específico sobre la producción de fruto de tomate parece depender de la forma química de Se aplicada, como indican también Becvort-Azcurra et al. (2012) quienes no encontraron diferencias en el rendimiento del fruto al aplicar selenito de sodio. De la misma manera, para Pezzarossa et al. (2013), el rendimiento del fruto de tomate no fue estadísticamente influenciado por la adición de selenato de sodio, mientras que Carvalho et al. (2003) reportaron diferencia negativa contra el testigo al aplicar una fuente orgánica de Se, al no existir producción de frutos de tomate. Aunque el rendimiento no fue estadísticamente favorecido, existe un efecto en aumento que puede ser reflejado cuando la producción del cultivo es llevada a una mayor escala, este efecto concuerda con lo reportado por Germ et al. (2005).

5.2 Variables agronómicas y de calidad de frutos

Las variables de longitud de tallo (ALT), diámetro de tallo (DT), sólidos solubles totales de fruto (SST), firmeza y diámetro de frutos (DP y DE) fueron incrementadas significativamente bajo la influencia de los tratamientos de selenio (2 y 5 mg L⁻¹). Estas respuestas positivas observadas en las plantas son consistentes con las reportadas por Hartikainen et al. (2000), cuando la concentración de Se en las hojas de *Lolium perenne* L. fue menor que 10 mg kg⁻¹. Estos resultados también son consistentes con los reportados por otros autores acerca de los efectos positivos de la adición de Se en especies tales como *Lolium perenne* (Hartikainen et al. 2000), *Lactuca sativa* (Xue et al. 2001) y *Solanum tuberosum* (Turakainen et al. 2004). En tanto que, la MST no fue modificada en tallos y frutos, únicamente en hojas bajo la influencia de la mayor aplicación de Se (5 mg L⁻¹). Un comportamiento similar fue reportado por Becvort-Azcurra et al. (2012), quienes no encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la

MST tanto en hojas, tallos y frutos posteriormente a la adición de Se en plantas de tomate.

5.3 Cuantificación de selenio

Los resultados de hojas y tallos indicaron aumento significativo en la acumulación de selenio bajo la influencia de ambos tratamientos aplicados. En los frutos únicamente se reportó un aumento notable bajo el tratamiento 5 mg L⁻¹, este resultado corresponde a un 53.1% más selenio sobre las plantas control, lo cual es superior a lo reportado por Nancy et al. (2014) en frutos de tomate (29.5 µg g⁻¹) desarrollados con 10 mg L⁻¹ de selenato de sodio a través de la aplicación en el suelo y una tasa de acumulación de 52.5% sobre las plantas control. Otros reportes han confirmado la acumulación de Se en granos de trigo (Nawaz et al. 2014) y granos de arroz (Boldrin et al. 2013) por medio de la fertirrigación con Se y aplicación foliar de Se respectivamente. El efecto del Se en las plantas depende principalmente de su concentración. De acuerdo con Hamilton (2004), el Se tiene tres niveles de actividad biológica: 1) concentraciones traza son requeridas para el crecimiento normal y el desarrollo; 2) concentraciones moderadas pueden ser almacenadas para mantener las funciones homeostáticas; y 3) altas concentraciones que pueden resultar en efectos tóxicos. Los estudios en *Lolium perenne* y *Lactuca sativa* han mostrado que a pesar de que el Se es dañino para las plantas en concentraciones superiores a 10 y 1.0 mg kg⁻¹ respectivamente, éste podría ejercer efectos benéficos a bajas concentraciones (Hartikainen et al. 2000; Xue et al. 2001). Al respecto, Becvort-Azcurra et al. (2012), encontraron efectos tóxicos en plantas de tomate cuando aplicaron 10 y 20 mg L⁻¹ en la solución nutritiva.

Por otra parte, los valores de la concentración de Se en hojas, tallos y frutos bajo todos los tratamientos aplicados en este estudio fueron más altos que aquellos reportados por Becvort-Azcurra et al. (2012). Es posible que esta diferencia sea debido al uso de suelo y perlita como sustrato por estos autores, el cual muy probablemente modificó la disponibilidad del selenio. Además, los valores de Se en los frutos de las plantas control fueron altos comparados con aquellos reportados por Eurola et al. (1989) y por Becvort-Azcurra et al. (2012), quienes agregaron el Se al suelo.

Referente a la acumulación de selenio en los diferentes órganos de la planta, Kabata-Pendias y Pendias (2001), reportaron una acumulación desigual entre los diferentes órganos; los tejidos en crecimiento activo usualmente contienen más altas cantidades de Se, y muchas especies de plantas acumulan más altas cantidades de selenio en tallos y hojas que en los tejidos de la raíz. Nuestros resultados no concuerdan con los anteriormente mencionados.

Un resultado similar fue reportado por Arvy (1993) y Becvort-Azcurra et al. (2012), quienes encontraron las más altas concentraciones de selenio en los tallos, seguido de las hojas y de los frutos. Si únicamente se comparan hojas y frutos, fue obtenida una acumulación más alta en frutos que en el control, mientras Nancy et al. (2014) reportaron valores más altos en las hojas.

5.4 Cuantificación de macronutrientes

Lo esperado y lo encontrado en este estudio respecto a la acumulación de los macronutrientes en los diferentes tejidos de la planta sugiere que no haya modificación alguna al adicionar selenio en la solución de riego debido a que, de esta manera no existe un antagonismo por parte del selenio y los demás elementos nutrientes. Esto no concuerda con Kabata-Pendias y Pendias (2001), quienes notaron que a niveles más altos de selenio en plantas pueden suprimir la concentración de N en tejidos y pueden inhibir la absorción de algunos metales tales como Mg. Mientras tanto Smoleń et al. (2014), reportaron una reducción en los niveles de Ca y Mg en raíces de lechuga con la aplicación foliar de Se y I, aunque no observaron ninguna diferencia en el contenido de macronutrientes en hojas cuando aplicaron Se individualmente.

5.5 Potencial de óxido-reducción

El aumento en la capacidad de óxido-reducción posiblemente tiene relación con una mayor actividad enzimática, la cual se tiene conocimiento, aumenta a ciertas concentraciones de selenio (Freeman et al. 2010). Los valores de ORP indican paralelamente habilidad general de capacidad antioxidante total de ceder electrones en comparación con un electrodo de hidrógeno y la capacidad para reducir sustancias pro-

oxidantes mediante el uso de diferentes radicales o iones metálicos como oxidantes, considerando que la capacidad antioxidante total no se refiere a un antioxidante o antioxidantes específicos, sino en general al potencial de cesión de electrones para inactivar radicales libres (Schleiser et al. 2002). Becvort-Azcurra et al. (2012), mencionan que aplicaciones superiores de 10 y 20 mg L⁻¹ de Se, disminuyeron en un 25% la capacidad antioxidante total del fruto, pudiendo ser el resultado de la acumulación excesiva de selenio en la planta ya que de acuerdo con Hawrylak-Nowak (2008), el selenio en baja concentración en las plantas da lugar a un aumento de la capacidad antioxidante, mientras que en mayor concentración causa el efecto contrario. Por tanto en los resultados obtenidos en este estudio indican que la aplicación de selenio a bajas concentraciones induce un aumento en la capacidad antioxidante total del fruto, coincidiendo esto con lo reportado por otros autores (Hartikainen et al. 2000; Lee et al. 2001; Xue et al. 2001, 2003; Ligan et al. 2005).

5.6 Antioxidantes protéicos

5.6.1 Actividad catalasa

Se ha demostrado que el Se está asociado con una mayor capacidad antioxidante en las plantas sujetas a varios tipos de estrés (Djanaguiraman et al. 2005). La aplicación de Se en el trigo dio lugar a mayor actividad de enzimas óxido reductasas en especial de la catalasa (Nowak et al. 2004) así como de la ascorbato peroxidasa y la glutatión reductasa (Kaklewski et al. 2008), que se sabe son enzimas involucradas en el ciclo Halliwell-Asada y que de igual forma que la catalasa disocian el H₂O₂. Si bien no se dispone de una explicación completa acerca de los cambios en la actividad de las enzimas se supone que ocurren en parte por la sustitución del S por Se en las proteínas (Valkama et al. 2003).

5.6.2 Actividad glutatión peroxidasa

Ríos et al. (2009), encontraron el mismo resultado sobre la glutatión peroxidasa, al igual que otra peroxidasa como la ascorbato peroxidasa, en plantas de lechuga tratadas con selenato de sodio. Esto coincide con otros estudios con aplicación de Se en los

cuales se observó aumento en la actividad GPX (Hartikainen et al. 2000; Xue et al. 2001; Djanaguiraman et al. 2005; Ríos et al. 2009) Por su parte, Cartes et al. (2005) demostraron que el selenito es más eficiente que el selenato como un inductor de la actividad glutatión peroxidasa en plantas de césped inglés (*Lolium perenne* L.).

5.6.3 Actividad superóxido dismutasa

La enzima SOD tiene como función transformar el radical superóxido en H_2O_2 (Gratao et al. 2005), por lo que su acción está correlacionada con la de la enzima CAT (Ramírez-Serrano et al. 2008). Ríos et al. (2009) obtuvieron igualmente mayor actividad SOD, reportando una mayor efectividad sobre esta respuesta del selenito sobre el selenato. Sreekala et al. (1999) también reportaron que la actividad SOD mitocondrial aumentó con la suplementación de Se en *Trigonella foenum-graecum*.

5.7 Antioxidantes no protéicos

5.7.1 Ácido ascórbico (AA) y licopeno

La inducción de antioxidantes no enzimáticos fue reportada también en la lechuga al aplicar selenato de sodio (Ríos et al. 2009) y en el tomate por Lee et al. (2007) y Pezzarossa et al. (2013) coincidiendo para estos dos últimos, con el aumento en el licopeno del fruto. Hasta donde se sabe no se dispone de información acerca del mecanismo de acción del Se sobre estas variables del fruto. Los SST del fruto, dependientes principalmente de la sacarosa contenida en los tejidos, parecen constituir un resumen del efecto general del entorno sobre la planta (Prado 2002). Por otra parte el AA se deriva de la glucosa y es uno de los antioxidantes no enzimáticos más importantes, reportándose que el Se (Duma et al. 2011) y algunos reguladores del crecimiento modifican positivamente su concentración (Ramírez et al. 2010). Posiblemente el efecto del Se tenga que ver parcialmente con una mejora en la economía del C, tal como se demostró en *Solanum tuberosum* que acumuló más carbohidratos y presentó mayores SST al aplicarle Se (Turakainen et al. 2004).

5.8 Expresión génica en los frutos

Se sabe que en el fruto los genes estudiados muestran expresión controlada a través del desarrollo y maduración, encontrándose que *cat* se ve incrementado mientras que *gpx* y *apx* disminuyen al madurar el fruto (Jiménez et al. 2002). En el presente estudio los frutos caracterizados se encontraban todos en la misma etapa de madurez y aun así mostraron fuertes diferencias en la expresión de los genes *gpx*, *sod* y *apx*, ello asociado a la presencia de Se en distintas concentraciones.

A través de la expresión diferencial de los genes, el balance redox celular regula diferentes aspectos de la vida de las plantas, entre ellos el desarrollo, el ajuste a los factores ambientales y la defensa contra el estrés oxidativo. Este balance redox depende de un balance fino entre la cantidad de especies activas de oxígeno y la concentración de antioxidantes (Gadjev et al. 2006). Las aplicaciones de Se causan modificaciones en el balance redox celular y por ende cambian el nivel de expresión de algunos genes, particularmente los relacionados con el metabolismo antioxidante (Van Hoewyk et al. 2008).

El nivel de sobre expresión de los genes *cat*, *gpx*, *sod*, *apx* y *lic* únicamente bajo la aplicación del tratamiento 2 mg L⁻¹ puede indicar un fenómeno de hormesis, en el que el estímulo de expresión depende de las concentración de Se aplicada (Calabrese y Baldwin 2002). El tratamiento de aplicación de 5 mg L⁻¹, si bien no reprimió la expresión, causó en general un menor nivel de expresión. Se sabe que una de las funciones de las enzimas antioxidantes en los frutos es regular la tasa de maduración de los frutos y retardar la senescencia de los mismos (Baquero et al. 2005), por ello el Se pudiera ser útil para manipular no solo la calidad nutricional, sino posiblemente la maduración poscosecha del fruto.

VI. CONCLUSIONES

Las variables de crecimiento, altura de la planta, diámetro de tallos, firmeza de frutos y sólidos solubles de frutos respondieron positivamente a la aplicación de selenio, mientras que esta aplicación no causó interferencia con la absorción de N, P, K, Ca y Mg. La adición de selenio en la solución nutritiva incrementó significativamente la concentración de este elemento en los diferentes órganos de la planta; el tratamiento 5 mg L⁻¹ permitió hasta el doble de la concentración de este elemento en frutos comparado con el tratamiento control. Esta concentración de selenio en frutos fue positivamente correlacionada con la concentración en hojas y tallos. Además, el Se resultó en un incremento en la actividad enzimática de catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en frutos con el mayor tratamiento aplicado (60.9, 33.4 y 26.0% de aumento respectivamente), a pesar que los análisis de marcadores de estrés oxidativo tales como peróxido de hidrógeno y/o peroxidación lipídica son necesarios para un mejor entendimiento de este cuadro antioxidante. Los frutos bajo ambos tratamientos de Se (2 y 5 mg L⁻¹) mostraron mayor acumulación de ácido ascórbico respecto al testigo y, en el caso del tratamiento de 5 mg L⁻¹ un 66.9 % más de licopeno. Por su parte, el mayor nivel de transcriptos de los genes *gpx*, *sod* y *apx* ocurrió con el tratamiento de 2 mg L⁻¹. Los demás genes fueron expresados aunque en un nivel menor.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal of Andrology* 26(6):654-660.

Asociación Mexicana de Nutriología A. C. (2009).
<http://www.asociaciondenutriologia.org/>

Anguelova T, Warthesen J. 2000a. Lycopene stability in tomato powders. *Journal of Food Science*, 65(1):67-70.

A. O. A. C. 1980. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 13th Ed. Washington, DC. USA, 1038pp.

A.O.A.C. 1990. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist* 15th ed. (pp. 829-830). Washington, D.C. USA.

A.O.A.C. 2000. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* 17th ed. (pp. 2000). Gaithersburg, M.D. USA.

Arias R, Lee T, Logendra L, Janes H. 2000. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L, a, b color reading of a hidroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:1697-1702.

Arthur JR. 2003. Selenium Supplementation: Does Soil Supplementation Help and Why?. *Proc. Nutr. Soc.* 62:393-397.

Arvy MP. 1993. Selenate and Selenite Uptake and Translocation in Bean Plants (*Phaseolus vulgaris*). *J. Exp. Bot.* 44:1083-1087.

ATSDR. 2009. Toxicological Profile for Selenium. Atlanta: US Department of Health and Human Services.

Bañuelos GS, Ajwa HA, Mackey M. 1997. Evaluation of different plant species used for phytoremediation of high soil selenium, J. Environment. Quality 26:639-646.

Baquero DEL, Castro RJA, Narváez CCE. 2005. Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): maduración y senescencia. Acta Biológica Colombiana 10:49-59.

Becvort-Azcurra A, Fuentes-Lara LO, Benavides-Mendoza A, Ramírez H, Robledo-Torres V, Rodríguez-Mendoza M de las N. 2012. Aplicación de selenio en tomate: crecimiento, productividad y estado antioxidante del fruto. Terra Latinoamericana, 30: 291-301.

Benavides-Mendoza A, Ramírez H, Robledo-Torres V, Fuentes-Lara LO. 2009. Antioxidantes en las plantas: algunos factores edáficos y ambientales que los modifican. En: A. Benavides-Mendoza (Compilador). Temas Modernos de Nutrición Vegetal, A.C., pp. 13-26. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Texcoco, México.

Boldrin PF, Faquin V, Ramos SJ, Boldrin KVF, Avila FW, Guilherme LRG. 2013. Soil and Foliar Application of Selenium in Rice Biofortification. J. Food Compos. Anal. 31:238-244.

Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Broadley MR, White PJ, Bryson RJ, Meacham MC, Bowen HC, Johnson SE, Hawkesford MJ, Mc Grath SP, Zhao FJ, Breward N, Harriman M, Tucker M. 2006. Biofortification of UK Food Crops with Selenium. Proc. Nutr. Soc. 65:169-181.

Brown TA, Shrift A. 1982. Selenium; toxicity and tolerance in higher plants. Biol. Rev. 57:59-84.

Brummell DA, Watson LM, Pathirana R, Joyce NI, West PJ, Hunter DA, McKenzie MJ. 2011. Biofortification of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit with the anticancer compound methylselenocysteine using a selenocysteine methyltransferase from a selenium hyperaccumulator. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59:10987-10994.

Burnell JN, Shrift A. 1979. Cysteinyl-tRNA synthetase from Astragalus species. Plant physiology 63(6):1095-1097.

Calabrese EJ, Baldwin LA. 2002. Defining hormesis. Human and Experimental Toxicology 21:91-97.

Cartes P, Gianfreda L, Mora ML. 2005. Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenite and selenite forms. Plant Soil 276:359-367.

Cartes P, Shene C, Mora M. 2006. Selenium Distribution in Ryegrass and its Antioxidant Role as Affected by Sulfur Fertilization. Plant Soil 285:187-195.

Carvalho KM, Gallardo-Williams MT, Benson RF, Martin DF. 2003. Effects of selenium supplementation on four agricultural crops. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 704-709.

Céspedes-Cabrera T, Sánchez-Serrano D. 2000. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. Revista Cubana de Cardiología 14:55-60.

Chance B, Maehly AC. 1955. Assay of catalases and peroxidases. En: Colowick SP, Kaplan NO, eds. Methods in enzymology. New York: Academic 764-5.

Clinton SK. 1998. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. Nutr Rev 56:35-51.

Combs GF, Combs S. 1986. The Role of Selenium in Nutrition. Academic Press, New York.

Combs GF Jr. 2001. Selenium in Global Food Systems. *Brit. J. Nutr.* 85:17-547.

COVECA (Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria). 2010. Monografía del tomate rojo. <http://faostat.fao.org>.

Cruz-Jimenez G. 2005. Toxicity and accumulation of selenium by plant. Species from Chihuahua desert. Tesis doctoral. The University of Texas at El Paso. El Paso, Texas, USA pp. 50-51.

Davis C. 2002. Selenium enriched broccoli decreases intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia mice. *J. Nutr.* 31:1802-1808.

De Kok LJ, Kuiper PJC. 1986. Effect of short-term dark incubation with sulfate, chloride and selenate on the glutathione content of spinach leaf discs. *Physiologia Plantarum*, 68:477-482.

De Souza MP, Pilon-Smits EAH, Lytle CM, Hwang S, Tai J, Honma TS, Yeh L, Terry N. 1998. Rate-limiting Steps in Selenium Assimilation and Volatilization by Indian Mustard. *Plant Physiol.* 117:1487-1494.

Diplock AT. 1993. Indexes of selenium status in human population. *Am. J. Clin. Nutr.* 57:256-259.

Djanaguiraman M, Devi DD, Shanker AK, Sheeba A, Bangarusamy U. 2005. Selenium-an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant Soil* 272:77-86.

Duma M, Alsina I, Dubova L, Stroska L, Smiltina Z. 2011. The effect of sodium selenite and selenate on the quality of lettuce. In Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology “Innovations for Food Science and Production” “FoodBalt” (pp. 39-44). Latvia: University of Agriculture, Jelgava.

Eurola M, Ekholm P, Ylinen M, Koivistoinen P, Varo P. 1989. Effects of Selenium Fertilization on the Selenium Content of Selected Finnish Fruits and Vegetables. *Acta Agr. Scand.* 39:345-350.

Fan RWM, The SJ, Hinton DE, Higashi RM. 2002. Selenium biotransformations in to proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *J. Aquatic Toxicol.* 57:65-84.

Feng R, Chaoyang W, Tu S. 2013. The Roles of Selenium in Protecting Plants Against Abiotic Stresses. *Environ. Exp. Bot.* 87:58-68.

Fordyce F. 2005. Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: *Essentials of medical geology*, Selinus, O., B. Alloway, J. Centeno, R, Finkelman, R. Fuge, U. Lindh and P Smedley (Eds.). Elsevier. pp 373-415.

Foreign Agricultural Service. United States Department of Agriculture. 2001. <http://www.fas.usda.gov/>

Foyer C, Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *J. Plant Cell Environment* 28:1056-1071.

Freeman JL, Tamaoki M, Stushnoff C, Colin F, Cappa D, Sirine F, Matthew M, McGrath S, Doug Van H, Pilon-Smits EAH. 2010. Molecular mechanish of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnatifida*. *J. Plant Physiology* 153:1630-1652.

Fridovich I. 1974. Superoxide dismutases. In: *Advances in Enzymology* (Meister, A, ed.), 35-97. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.

Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev T, Laloi C, Minkov IN, Shulaev V, Apel K, Inze D, Mittler R, Van Breusegem F. 2006. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 141:436-445.

Galiana-Balague L, Adalid A, Nuez F. 2008. Influencia del ambiente en la evaluación del contenido de vitamina C en germoplasma de *Lycopersicon*. Centro de conservación y mejora de la agrobiodiversidad valenciana (COMAV), Universidad Politécnica de Valencia. pp. 2.

García-Triana B, García-Morales O, Clapes-Hernández S, Rodes-Fernández L, García-Piñeiro J. 1995. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I Superóxido dismutasas. Rev Cubana Invest Biomed Vol. 14. Nº 1.

Germ M, Kreft I, Osvald J. 2005. Influence of UV-B Exclusion and Selenium Treatment on Photochemical Efficiency of Photosystem II, Yield and Respiratory Potential in Pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). Plant Physiol. Bioch. 43:445-448.

Gonzalez MM, Nadrid R, Arahuetes RM. 2000. Physiological changes in antioxidant defences in fetal and neonatal rat liver. Reproduction Fertility and Development 7:1375-1380.

Gratao PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Functional Plant Biology 32:481-494.

Hadju J, Wyss SR, Aebi H. 1977. Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents: symmetry of the quaternary structure. Eur J Biochem. 80:199-207.

Hadley CW, Clinton SK, Schwartz SJ. 2003. The consumption of processed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in association with a reduced lipoprotein sensitivity to oxidative damage. J Nutr. 133:727-32.

Hamilton SJ. 2004. Review of Selenium Toxicity in the Aquatic Food Chain. Sci. Total Environ. 326:1-31.

Hanson R (Ed.). 1983. *Rethinking urban policy: Urban development in an advanced economy*. National Academy Press.

Harris WD, Popat P. 1954. Determination of the Phosphorus Content of Lipids. J. Am. Oil Chem. Soc. 31:124-127.

Hartikainen H, Xue T, Piironen V. 2000. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. Plant and Soil 225:193-200.

Havir AE, McHale NA. 1989. Enhanced-peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley, and maize. Plant Physiol 91:812-815

Hawrylak-Nowak, B. 2008. Effects of selenium on selected macronutrients in Maize plants. University of life Science in Lublin. J. Chair of Physiology 13:513-519.

Hernández A, Vasallo P, Torres A, Salido E. 1995. Análisis del ARN: Estudio de la expresión génica. Nefrología 15(2):67-84.

Herr AJ, Baulcombe DC. 2004. RNA silencing pathways in plants. Quant Biol. 69:363-70.

ImageJ. Image Processing and Analysis in Java. <http://imagej.nih.gov/ij/>

INEGI 2001. (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). Banco de Información Electrónica. México. DF. Internet <http://www.inegi.gob.mx>.

Inostroza-Blancheteau C, Reyes-Díaz M, Alberdi M, Godoy K, Rojas-Lillo Y, Cartes P, Mora ML. 2013. Influence of selenite on selenium uptake, differential antioxidant performance and gene expression of sulfate transporters in wheat genotypes. Plant Soil 369:47-59.

Jackson MJ, Dillon SA, Bromme CS, McArdle A, Hart CA, McArdle F. 2004. Are there functional consequences of a reduction in selenium intake in UK subjects? J. Proc. Nutr. Soc. 63:513-517.

Jaffé WG, Chávez JF, Mondragón MC. 1969. Contenido de selenio en muestras de ajonjolí (*Sesamum indicum*) procedente de varios países. Arch Latinoam Nutr 19:299-305.

Jimenez A, Creissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeyen M, Mullineaux P. 2002. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. Planta 214:751-758.

Johnson IT. 2001. Antioxidants and Antitumour Properties. In: Antioxidants in Food, Pokorny, J., N. Yanishlieva and M. Gordon (Eds.). Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, pp:100-123.

Kabata-Pendias A, Pendias H. 2001. Trace Elements in Soils and Plants, 3rd Edition, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, pp:403.

Kahakachchi C, Boakye HT, Uden PC, Tyson JF. 2004. Chromatographic speciation of anionic and neutral selenium compounds in Se-accumulating *Brassica juncea* (*Indian mustard*) and in selenized yeast. J. Chromatogr A. 1054:303-312.

Kaklewski K, Nowak J, Ligocki M. 2008. Effects of selenium content in green parts of plants on the amount of ATP and ascorbate–glutathione cycle enzyme activity at various growth stages of wheat and oilseed rape. Journal of Plant Physiology 165:1011-1022.

Khachik F, Goli MB, Beecher GR, Holden J, Lusby WR, Tenorio MD, Barrera MR. 1992. Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40(3):390-398.

Lee MJ, Lee GP, Park KW. 2001. Effect of selenium on growth and quality in hydroponically grown Korean Mint (*Agastache rugosa*). Journal Korea Society Horticulture Science 42:483-486.

Lee GJ, Kang BK, Kim TI, Kim TJ, Kim JH. 2007. Effects of different selenium concentrations of the nutrient solution on the growth and quality of tomato fruit in hydroponics. *Acta Horticulturae* 761:443-448.

Li Y, Wei G, Chem J. 2004. Glutathione: a review on biotechnological production. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol* 66:233-242.

Lin L, Zhou W, Dai H, Cao F, Zhang G, Wu F. 2012. Selenium Reduces Cadmium Uptake and Mitigates Cadmium Toxicity in Rice. *J. Hazard. Mater* 235:343-351.

Lingan K, Mao W, Dongling B. 2005. Selenium modulates the activities of antioxidant enzymes, osmotic homeostasis and promotes the growth of sorrel seeding under salt stress. *Plant Growth Regulation* 45:155-163.

Lubinsky S, Bewley GC. 1979. Genetics of Catalase in *Drosophila melanogaster*: Rates of Synthesis and Degradation of the Enzyme in Flies Aneuploid and Euploid for the Structural Gene. *Genetics* 91:723-742.

Lynch M, Kuramitsu H. 2000. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes & Infection* 2:1245-1255.

Lyons G, Stangoulis J, Graham R. 2003. High-selenium Wheat: Biofortification for Better Healt. *Nutr. Res. Rev* 16:45-60.

Madhavi DL, Salunkhe DK. 1998. Tomato. *Food science and technology-New York-marcel dekker* En: *Handbook of vegetable science and technology. Production, storage and processing*, (D. K. Salunkhe y S. S. Kadam, eds.), pp.171-201. Marcel Dekker. EUA.

Martínez-Frías M. 2010. Structure and function of DNA and of the genes II. Types of alterations of the gene function through epigenetic processes. *Semergen-Medicina familiar* 36(6):332-335.

- Magos L, Berg GG. 1988. Selenium. in Biological Monitoring of Toxic Metals, T.W. Clarkson, L. Friberg, G.F. Nordberg y P.R. Sogger, (eds.) Plenum Press, New York, NY, pp. 383-405.
- Maiorino M, Chu FF, Ursini F, Davies KJ, Doroshow JH, Esworthy RS. 1991. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *Journal of Biological Chemistry* 266(12):7728-7732.
- Marschner H. 2002. Mineral nutrition in higher plants. 2 ed. Academic Press. London, UK.
- Martínez-Valverde I, Periago MJ, Provan G, Chesson A. 2002. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in comercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Journal of the Science of Food Agriculture* 82(3)323-330
- Mayland HF. 1994. Selenium in plant and animal nutrition. in Selenium in the Environment, W.T. Frankenberger, Jr. y S. Benson (eds.) Marcel-Dekker, Inc. New York, NY, pp. 29-45.
- Mengel K, Kirby EA. 1987. Principles of plant nutrition. 2 ed. International Potash Institute. Bern. Switzerland.
- Mikkelsen RL, Page AL, Bingham AT. 1989. Factors affecting selenium accumulation by agricultural crops, *Soil Sci. soc. Am. Special Publications* 23:65-94.
- Mínguez-Mosquera MI. 1997. Clorofilas y Carotenoides en tecnología de alimentos. Universidad de Sevilla.
- Miranda HM, Castro CL. 2009. El estrés oxidativo en plantas. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular.
- Mondragón MC, Jaffé WG. 1976. Consumo de selenio en la ciudad de Caracas en comparación con otras ciudades del mundo. *Arch Latinoam Nutr* 26:341-352.

- Montes-Bayón M, LeDuc DL, Terry N, Caruso J. 2002. Selenium speciation in wild-type and genetically modified Se accumulating plants with HPLC separation and ICP-MS/ES-MS detection. *J Anal At Spectrom* 17:872-879.
- Morales FJ, Martínez AK, Velasco AC. 2002. Nuevos brotes de begomovirus en Colombia. *Fitopatol. Colomb* 26:75-79.
- Murillo E, Lombo O, Tique M, Méndez JJ. 2007. Potencial antioxidante de la *Bauhinia Kalbreyeri* Harms (FABACEAE). *Información Tecnológica* 18:65-74.
- Nancy D, Arulselvi PI. 2014. Effect of selenium fortification on biochemical activities of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* 4:3997-4005.
- National Research Council (US). 1980. Committee on Dietary Allowances, Food and Nutrition Board. *Recommended dietary allowances* (Vol. 2941). National Academies. Washington D.C.
- National Research Council (US). 1989. Committee on Dietary Allowances, Food and Nutrition Board. *Recommended Dietary Allowances*, 10th ed., Washington D.C.
- Nawaz F, Ashraf M, Ahmad R, Waraich EA, Shabbir RN, Bukhari MA. 2014. Supplemental Selenium Improves Wheat Grain Yield and Quality Through Alterations in Biochemical Processes Under Normal and Water Deficit Conditions. *Food Chem* 175:350-357.
- Nguyen ML, Schwartz SJ. 1999. Lycopene: Chemical and biological properties. *Food Technology* 53(2):38-44.
- Noctor G, Foyer C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol* 49:249-279.

- Nowak J, kaklewski K, Ligocki M. 2004. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1553-1558.
- Nuez F. 2001. El cultivo de tomate. Segunda edición Editorial Mundi Prensa. pp. 32-33, 53-55, 60.
- Nuño Moreno R, Ponce Medina JF, Hernandez Zavalza C, Machain Servín GM. 2007. Manual de producción de tomate rojo bajo condiciones de invernadero. Fundación produce. Mexicali. Baja California. México. pp 3-4.
- Ogawa K. 2005. Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. *Antioxidant and Redox Signaling* 7:973-981.
- Oldfield JE. 1995. Selenium: it's Uses in Agriculture, Nutrition and Health and the Environment, Selenium–Tellurium Development Association, Grimbergen, Belgium.
- Padmaja K, Prasad DDK, Prasad ARK. 1989. Effect of selenium on chlorophyll biosynthesis in mung bean seedlings, *Phytochemistry* 28:3321-3324.
- Pezzarossa B, Rosellini I, Malorgio F, Borghesi E, Tonutti P. 2013. Effects of selenium enrichment of tomato plants on ripe fruit metabolism and composition. *Acta Horticulturae*, 1012:247-251.
- Poggi V, Arcioni A, Filippini P, Pifferi PG. 2000. Foliar application of selenite and selenate to potato (*Solanum tuberosum*): effect of a ligand agent on selenium content of tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:4749-4751.
- Pilon-Smits EAH. 2005. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* 56:15-39
- Pisabarro AG, Pérez G, Lavín JL, Ramírez L. 2008. Genetic networks for the functional study of genomes. *Briefings in functional genomics & proteomics* 7(4):249-263.
- Prado JL. 2002. Tipos y especificaciones de calidad en el cultivo del tomate. *Vida Rural* 148:9-14.

Preciado-Rangel P, Favela-Chavez E, Benavides-Mendoza A. 2006. *Manual para la Preparación de Soluciones Nutritivas*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México, 146pp.

Presser TS. 1994. Geologic origin and pathways of selenium from California Coast Ranges to the west-central San Joaquin Valley. in *Selenium in the Environment*, W.T. Frankenberger, Jr. y S. Benson, (eds.) Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 139-156.

Ramírez H, Rivera-Cruz CE, Benavidez-Mendoza A, Robledo-Torres V, Reyna-Sustaita G. 2010. Proheaxiona-Ca, una alternativa en la producción de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 16:139-146.

Ramírez-Serrano R, Larrinaga-Mayoral JA, Murillo-Amador B, Hernández-Saavedra NY, Fujiyama H. 2008. Antioxidant enzymatic response of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) under saline stress conditions. *Interciencia* 33:377-388.

Rayman MP. 2002. The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society* 61:203-215.

Rayman MP. 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society* 64:527-542.

Raymond PM. 2002. Selenium in cáncer prevention: A review of the evidence and mechanism of action. J. *Proceedings of the nutrit. Soc* 64:527-542.

Ré R, Bramley PM, Rice-Evans. 2002. Effects of food processing on flavonoids and lycopene status in a mediterranean tomato variety. *Free Radical Research* 36(7):803-810.

Reilly K, Valverde J, Finn L, Gaffney M, Rai DK, Brunton N. 2014. A note on the effectiveness of seleniu, supplementation of Irish-grown *Allium* crops. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 53:91-99.

- Ríos JJ, Blasco B, Cervilla LM, Rosales MA, Sanchez-Rodriguez E, Romero L, Ruiz JM. 2009. Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium. *Annals of Applied Biology* 154:107-116.
- Rodríguez R, Tavares R, Medina. 2001. Cultivo moderno de tomate. Segunda edición. Mundi Prensa, Madrid, España. pp. 255.
- Sahnoun Z, Jamoussie K, Zegal KM. 1997. Free Radicals and Antioxidants: Human Physiology and Therapeutic Aspects. *Therapie* 52:251-70.
- Saldaña C, Nina J, Sánchez G. 2003. Las plagas del cultivo de tomate industrial en el valle de Barranca. 33 Resúmenes. XLII Convención Nacional de Entomología. Tarapoto, Sociedad Entomológica de Perú.
- Sams CE, Panthee DR, Charron CS, Kopsell DA, Yuan JS. 2011. Selenium regulates gene expression for glucosinolate and carotenoid biosynthesis in arabidopsis. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 136:23-34.
- Santisteban P. 1995. Los pasos desde la membrana al núcleo: sistemas de transducción de señales y mecanismos reguladores de la transcripción. In *Anales de la Real Academia de Farmacia* pp. 791-824.
- Schiavon M, Dall'acqua S, Mietto A, Pilon-Smits EA, Sambo P, Masi A, Malagoli M. 2013. Selenium fertilization alters the chemical composition and antioxidant constituents of tomato (*Solanum lycopersicon* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 10542-10554.
- Schleiser H, Hawat V, Bohm V, Bitsch R. 2002. Assesment of antioxidant by using different in vitro methods. *Free Radical Research* 36:177-187.
- Seppanen M, Turakainen M, Hartikainen H. 2003. Selenium effects on oxidative stress in potato. *J. Plant and Sciense* 165:311-319.

- Shardendu SN, Boulyga SF, Stengel E. 2003. Phytoremediation of selenium by two helophyte species in subsurface flow constructed wetland. *J. Chemosphere* 50:967-973.
- Shekelle P, Hardy ML, Coulter I, Udani J, Spar M, Oda K. 2003. Effect of the supplemental use of antioxidants vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 for the prevention and treatment of cancer. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 75:1-3.
- Shi J, Le Maguer M. 2000. Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Biotechnology* 20(4):293-334.
- SIAP 2012. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx/index.php>.
- Smirnoff N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. J. Plant Biol* 3:229-235.
- Smoleń S, Kowalska I, Sady W. 2014. Assessment of Biofortification With Iodine and Selenium of Lettuce Cultivated in the NFT Hydroponic System. *Sci. Hort* 166:9-16.
- Sreekala M, Santosh TR, Lalith K. 1999. Oxidative stress during selenium deficiency in seedlings of *Trigonella foenum-graecum* and mitigation by mirnosine. Part I. hydroperoxide metabolism. *Biological Trace Element Research* 70:193-207.
- Srivastava SK, Ansari NH. 1980. The peroxidatic and catalitic activity of catalase in normal and acatalasemic mouse liver. *Biochem Biophys Acta* 633:317-22
- Steiner AA. 1961. A Universal Method for Preparing Nutrient Solutions of a Certain Desired Composition. *Plant Soil* 15:134-154.
- Terry N, Carlson C, Raab TK, Zayed AM. 1992. Selenium uptake and volatilization among crop species, *J. Environ. Quality* 21:341-344.

Terry N, Zayed AM, De Souza MP, Tarun AS. 2000. Selenium in Higher Plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol 51:401-432.

Thomson J, Elgar S, Herbers THC. 2005. Reflection and tunneling of ocean waves observed at a submarine canyon, Geophys. Res. Lett.

Tonucci LH, Holden JM, Beecher GR, Khachik F, Davis CS, Mulokozi G. 1995. Carotenoid content of thermally processed tomato-based food products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43:579-586.

Turakainen M, Hartikainen H, Seppänen MM. 2004. Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52:5378-5382.

USDA. 1997. United States Department of Agriculture. Agricultural marketing Service. United States standards for grades of fresh tomatoes. <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5050331>.
Universidad de Sevilla. España.

Valadez LA. 2001. Libro de Producción de hortalizas. Editorial Limusa. México.

Valkama E, Kivimaenpaa M, Hartikainen H, Wulff A. 2003. The combined effects of enhanced UV-B radiation and selenium on growth, chlorophyll fluorescence and ultrastructure in strawberry (*Fragaria * ananassa*) and barley (*Hordeum vulgare*) treated in the field. Agricultural and Forest Meteorology 120:267-78.

Van Hoewyk D, Takahashi H, Inoue E, Hess A, Tamaoki M, Pilon-Smits EA. 2008. Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in Arabidopsis. Physiologia Plantarum 132:236-253.

Vavilov NL. 1951. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Translated by K. Start. Chron. Bot 13:1-366.

- Villarreal RR. 1982. Origen y distribución de tomate. Primera edición en español. Costa Rica. pp. 66.
- White PJ, Browen HC, Parmaguru P, Fritz M, Spraclen WP, Spiby RE. 2004. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany 55:1927-1937.
- Wu L, Huang ZZ, Burau RG. 1998. Selenium accumulation and selenium-salt co-tolerance in five grass species, Crop Sci 28:517-522.
- Xue T, Hartikainen H, Piironen V. 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium in senescing lettuce. Plant Soil 27:55-61.
- Xue H, Tong KL, Marck C, Grosjean H, Tze-Fei J. 2003. Transfer RNA paralogs: evidence for genetic code-amino acid biosynthesis coevolution and an archaeal root of life. Gene 310:59-66.
- Yanishlieva-Maslarova NV. 2001. Inhibiting oxidation. In: *Antioxidants in Food Practical Applications*. J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon (Ed.), Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp. 22-70.
- Yeung D. 2001. *Lycopene: The facts*. www.lycopene.org
- Zayed A, Lytle CM, Terry N. 1998. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. Plant 206:284-292.
- Zhang YQ, Roote J, Brogna S, Davis AW, Barbash DA, Nash D, Ashburner M. 1999. Stress sensitive B encodes an Adenine Nucleotide Translocase in *Drosophila melanogaster*. Genetics 153:891-903.
- Zhang Y, Gladyshev VN. 2001. General trends in trace element utilization revealed by comparative genomic analyses of Co, Cu, Mo, Ni and Se. Journal of Biological Chemistry 285:3393-3405.

Zhao XQ, Mitani N, Yamaji N, Shen RF, Ma JF. 2010. Involvement of Silicon Influx Transporter OsNIP2;1 in Selenite Uptake in Rice. *Plant Physiol* 153:1871-1877.

IX. RESUMEN BIOGRÁFICO

1. Datos Generales

Nombre completo: Rocío Guadalupe Castillo Godina

Domicilio particular: Ignacio Altamirano 904 Col. Chamizal Saltillo, Coahuila

Correo electrónico: rociogcg@hotmail.com

Teléfono: (844) 4360345 y 8441754537

2. Formación Académica

Licenciatura: Químico Farmaco Biólogo con acentuación en Microbiología.

Universidad Autónoma de Coahuila. 2007

Maestría: Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Coahuila. 2010

3. Participación en Congresos como Ponente y publicaciones en memorias

CICLO DE CONFERENCIAS SOBRE NUTRICIÓN Y METABOLISMO DE PLANTAS HORTÍCOLAS DEL DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Ponente invitada presentando “Importancia del selenio para las plantas”. Saltillo, Coah., 2013.

4TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOMATO DISEASES AND 28TH U.S ANNUAL TOMATO DISEASE WORK SHOP. Ponente invitada presentando el trabajo de investigación “Tolerance response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato plants with selenium”. Orlando FL., 2013.

X ENCUESTRO PARTICIPACIÓN DE LA MUJER EN LA CIENCIA. Presentación sesión poster del trabajo “Cuantificación de ácido ascórbico en el tejido foliar y frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) con aplicaciones de selenio. León Guanajuato, 2013.

4. Artículo con arbitraje

Effect of Selenium on Elemental Concentration and Antioxidant Enzymatic Activity of Tomato Plants. Autores: R. G. Castillo-Godina, R. Foroughbakhch-Pournavab, A. Benavides-Mendoza. Aceptado para su publicación. Revista: Journal of Agricultural Science and Technology.

Effects of Selenium Supplementation on Antioxidant Metabolism of Tomato Fruit. Autores: R.G. Castillo-Godina, R. Foroughbakhch-Pournavab, S. González-Morales, A. Benavides-Mendoza. Enviado para su publicación. Revista: CyTA Journal of Food.

5. Experiencia profesional

Asesor externo de la tesis de licenciatura Impacto del Selenio Sobre la Producción y Calidad del Fruto de Tomate (*Lycopersicon esculentum* L. Mill). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 2015.

Docente en la Universidad Autónoma del Noreste impartiendo la materia de Microbiología General y de Alimentos, 2011. Y la materia Certificación y Normatividad Alimentaria, 2015.

X. ANEXO

Dr. A. Benavides-Mendoza,
Departamento de Horticultura,
Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro,
Saltillo, Mexico.

In the Name of Allah

Dear colleague Dr. Benavides-Mendoza,

I am pleased to inform you that your manuscript entitled:

"Effect of Selenium on Elemental Concentration and Antioxidant Enzymatic Activity of Tomato Plants" by: R. G. Castillo-Godina, R. Foroughbakhch-Pournavab, A. Benavides-Mendoza

has been accepted as an article for the Journal of Agricultural Science and Technology. Your article will be published in Vol. 18, No1, January 2016.

Sincerely Yours,



K. Poustini
Editor-in-Chief

Effect of selenium on elemental concentration and antioxidant enzymatic activity of tomato plants

Running title: Selenium and tomato antioxidant activity

Abstract. Selenium is an essential element for humans, so adding it to plants is convenient for biofortification. Thus, the aim of this work was to analyze experimentally the ability of sodium selenite to increase the concentration of Se and modify the antioxidant activity in tomato plants. We used plants of the Toro hybrid variety and applied three treatments: 0, 2 and 5 mg L⁻¹ of selenium as sodium selenite (Na₂SeO₃) using an irrigation system. Three samplings 40, 80 and 120 days after transplantation and a quantification of the accumulation of selenium and macronutrients in leaves, stems and fruits were carried out. Plant height, stem diameter, firmness and total solids of fruits and total dry matter were measured. The enzyme activity of catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase was quantified. The results indicated positive effects of Se on agronomic variables of the plants and fruit quality; however, fruit production showed no significant differences. Se had no effect on the concentration of the mineral macro and micronutrients. The addition of 5 mg L⁻¹ of Se resulted in significant increases in the concentration of selenium on a dry basis, reaching 20.4 µg g⁻¹ in leaves, 52.3 µg g⁻¹ in stems and 35.8 µg g⁻¹ in fruits. The increase in enzyme activity in the fruits was enhanced by the application of 5 mg L⁻¹ of Se; there was up to 352.7% more catalase activity, 312.2% more glutathione peroxidase activity, and 200.8% more superoxide dismutase activity compared with the control.

Keywords: biofortification, sodium selenite, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase.

INTRODUCTION

Eating healthy foods high in antioxidant nutrients contributes to the protection of cells from oxidative damage and to the prevention of various diseases (Broadley *et al.*, 2006). Free radicals cause oxidative chain reactions that are eliminated by the action of defensive antioxidant systems, including enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) according to Sahnoun *et al.* (1997). Antioxidant enzymes generally use trace elements such as selenium (Se) as cofactors, as in the case of GSH-Px (Arthur, 2003). Selenium is thought to be associated with antioxidant metabolism (Lin *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2013) through its role as a cofactor of selenoenzymes (Combs, 2001); its deficiency could induce changes in cellular redox balance. In humans, the average reference intake of Se is 60 to 75 µg per day, according to 1980 data from the U.S. Food and Nutrition Board (Broadley *et al.*, 2006); however, these values are well below the consumption levels cited by Combs (2001) and Broadley *et al.* (2006), indicating up to 300 µg per day for reducing the risk of cancer. Generally, cultivated plants that grow in non-seleniferous soils have low concentrations of Se, ranging from 0.01 to 1 mg kg⁻¹ dry weight. Thus, in some countries where soils are poor in selenium, it is added to the fertilizers used for agricultural production (Broadley *et al.*, 2006).

Selenium is metabolized in plants in the sulfur assimilation pathway, and its distribution and accumulation depends on the chemical species and the concentration of the element supplied by irrigation and through the leaves and on the nature and concentration of other substances in soil solution (Terry *et al.*, 2000). In the environment, selenium can be released by natural processes or induced by human activity and become incorporated

into the soil and water (White *et al.*, 2004). Regarding its chemical form, selenium is mobilized by various processes within plant cells. Thus, selenate (Se^{+6}) can be mobilized through a primary transport process coupled with a H^{+} -ATPase with the help of a sulfate (Terry *et al.*, 2000) or silicon transporter (Zhao *et al.*, 2010); once absorbed by plants, it remains in inorganic form (De Souza *et al.*, 1998; Cartes *et al.*, 2006). In contrast, the absorption of selenite (Se^{+4}) occurs differently (Terry *et al.*, 2000), that is, through a phosphate transporter (Zhao *et al.*, 2010). Once absorbed, selenite remains in organic form (De Souza *et al.*, 1998; Cartes *et al.*, 2006), and it has been shown to be a more efficient inducer of glutathione peroxidase (Cartes *et al.*, 2005).

Based on the above, the enrichment of food crops with selenium has been proposed as a strategy for improving the intake of selenium. The objectives of this study were 1) to document changes in plant growth and the concentration of mineral elements in different organs in response to the application of selenium (as sodium selenite) and 2) to analyze changes in certain antioxidant metabolites of the tomato plant *Lycopersicon esculentum* L. (Mill). This species was used as a biological model because it was characterized as a non-accumulator of selenium (White *et al.*, 2004).

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in 2012 at the agrarian university “Antonio Narro,” located in Saltillo, México. Tomato seeds of the hybrid saladette type "Toro" with determinate growth were seeded. The seedlings were grown in polystyrene trays with 200 cavities, and we monitored the growth and care of the seedlings for a period of 40 days. Subsequently, the seedlings were transplanted into 12 L pots, using peat moss and

perlite as substrates in a ratio of 70:30. Plants were grown in a shade house structure with a black shade polypropylene net that had a shade factor of 25 %. Maximum and minimum temperature and relative humidity were 25 and 18 °C and 50 and 65 %, respectively. Crop nutrition was addressed by means of Steiner's universal nutrient solution (Steiner, 1961) adjusted to a pH value of 5.5 to 6.5 with sulfuric acid to ensure the availability of mineral elements in the nutrient solution and keep the selenite ion in its protonated form (Preciado-Rangel *et al.*, 2006). The concentration of the solution applied was chosen according to the phenological stage: 25% in the initial stages and reaching 75% after flowering. The following treatments were applied to the plants: irrigation with a nutrient solution as a control (Steiner, 1961) and irrigation with the same nutrient solution plus 5 and 10 mg L⁻¹ of selenium, using reagent-grade anhydrous sodium selenite as a source (Na₂SeO₃, Sigma-Aldrich). The pruning of lateral buds and plant tutoring were performed every 8 days; pests and diseases were controlled by preventive applications of phytosanitary products, which do not contain selenium as indicated by the manufacturer. The variables assessed were obtained from three samplings taken 40, 80 and 120 days after transplantation. Leaf, stem and fruit tissues were taken at each sampling.

We used a completely randomized experimental design. An analysis of variance was carried out on agronomic and fruit variables and on mineral concentration and enzyme activity using the Statistical Analysis System (SAS) 9.1.3 software. A Tukey mean comparison test ($P \leq 0.05$) was performed to identify differences between treatments. The mean tests were applied independently to each plant organ. In addition, a rank

correlation test (Spearman R) was carried out to verify the statistical association between the concentrations of mineral elements in leaves, stems and fruits.

Fruit production. The number of fruits per plant (FPP) was obtained by harvesting the ripe fruits from 8 plants that were chosen completely at random from each treatment. The weight of the fruits was measured to obtain the production of fruits per plant (FWPP) in g plant⁻¹.

Agronomic variables. At each of the three samplings, plant height was measured as the stem length (SL) from the base of the stem to the last leaf in the aerial part of the plant using a tape measure; stem diameter (SD) was measured at the base of the plant by means of a vernier. The polar and equatorial diameters (PFD and EFD) of each fruit were measured using a simple vernier, firmness was measured using a manual penetrometer (QA Supplies, model FT011), and the amount of total soluble solids was measured using a hand refractometer (Atago Master Refractometer). To obtain the percentage of total dry matter (TDM), 6 plants were randomly selected from each treatment, and two physiologically mature leaves, stems and fruits were cut from them. The structures were weighed to obtain fresh weight; the stems were cut into pieces and the fruits into thin slices. They were then placed in a drying oven at a temperature of 60 °C for 48 hours. After that time, they were weighed again, and the percentage of total dry matter was calculated.

Determination of selenium and mineral nutrients. From the samples obtained for estimating TDM, a portion of 5 g was macerated in a porcelain mortar. One gram of the mash was taken and subjected to acid digestion with nitric and perchloric acid in a ratio of 3:1 using a hot plate at 100 °C. Subsequently, the solution was filtered with Whatman

filter paper (No. 42 ashless), and a working solution of 100 ml was prepared with the addition of deionized water. The reading was performed using an Induction Plasma Spectrometer (ICP), Thermo Jarell Ash brand, IRIS Advantage model, following the 984.27 method (A.O.A.C., 2000). The quantified nutrients were K, Mg and Ca, in addition to the corresponding quantification of selenium. Nitrogen was quantified by the Kjeldahl method (A.O.A.C., 1980), and P was quantified by the colorimetric method with an aminonaphthol sulfonic acid reagent. The reading was performed with a UV-Vis spectrophotometer (Genesys 10S Thermo Scientific) at an absorbance of 640 nm (Harris and Popat, 1954).

Activity of antioxidant proteins. For the preparation of the extracts of leaves, stems and fruits, we macerated 1 g of fresh tissue at each sampling in a mortar with liquid nitrogen; from the resulting mash, we took 0.3 g and transferred them to a 2.0 ml Eppendorf tube, adding 1.5 ml of phosphate buffer (pH 7) that had previously been stored at 4 °C. The tube containing the sample was subjected to a vortex (Genie 1 Touch Mixer Model SI-0136) to homogenize the sample; it was then sonicated (Branson Sonifier 1510 model 1510R-DTH) on ice for 10 minutes and then centrifuged in a refrigerated centrifuge (Prism Labnet International Inc.) at 12000 rpm for 10 minutes at 2 °C. The supernatant was separated and stored at -80 °C.

Total soluble proteins were quantified to determine relative enzyme activity. To perform this quantification, we used the extract mentioned above and placed 5 µL of the extract together with 250 µL of Bradford reagent (Bradford, 1976) into each of the wells of an ELISA multiplate; the reading was performed in a spectrophotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis) at an absorbance of 630 nm.

Catalase enzyme activity. Catalase activity was analyzed according to the modified method of Lubinsky and Bewley (1979) using UV-visible spectrophotometry at a wavelength of 275 nm. An amount of 20 μL was taken from the plant tissue extracts, and a 1:20 dilution was made with 380 μL of phosphate buffer (pH 7). A blank was prepared with 400 μL of phosphate buffer (pH 7), 150 μL of H_2SO_4 (2%) and 2 μL of H_2O_2 (30%). A time 0 was determined for the sample diluted 1:20 with 150 μL of H_2SO_4 (2%) and 2 μL of H_2O_2 (30%); it was called time 0 because the possible reaction was stopped previously with H_2SO_4 . At time 1, 2 μL of H_2O_2 (30%) were added to the sample diluted 1:20, and it was allowed to react for 1 min with vigorous stirring. Another 150 μL of H_2SO_4 (2%) was added to stop the reaction. This was done for each sample, and 275 nm was used for the readings (spectrophotometer UV-Vis Genesys 10S Thermo Scientific). A standard curve of H_2O_2 was made with concentrations of 0, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 100 mM. One unit of catalase is defined as 1 μmol of H_2O_2 mL^{-1} min^{-1} .

Glutathione peroxidase enzyme activity. The activity of glutathione peroxidase was measured using a modified version of the method of Xue *et al.* (2001). We used the same plant tissue extract used for previous quantifications. An amount of 0.2 mL was taken from the supernatant and placed in a 1.5 mL Eppendorf tube, adding 0.4 mL of GSH (0.1 mmol) and 0.2 mL of sodium and potassium buffer (0.067 M). After pre-heating the mixtures in a water bath at 25 °C for 5 min, 0.2 mL of H_2O_2 (1.3 mmol) was added to initiate the reaction. The reaction was held for 10 minutes and stopped by adding 1 ml of trichloroacetic acid (1%); the mixture was placed in an ice bath for 30 min and then centrifuged for 10 min at 3000 rpm. 0.48 mL was taken from the

supernatant and placed into a beaker, to which was added 2.2 mL Na₂HPO₄ (0.32 M) and 0.32 mL of 1.0 mmol 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) for color development. Absorbance was measured at a wavelength of 412 nm with a UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific Genesys 10S) after being left in repose for 5 min. We generated a standard curve for the pure enzyme obtained from a commercial Glutathione Peroxidase kit (GPx, Assay Science Cell Research Laboratories). A unit of glutathione peroxidase is defined as 1 mU of GSH-Px mL⁻¹ min⁻¹.

Superoxide dismutase enzyme activity. The quantification was done using an SOD kit (SOD assay kit Sigma-Aldrich 19160). A standard curve was generated as indicated by the SOD kit, and enzyme activity was calculated from the percentage of inhibition rate by incubating the mixtures at 37 °C for 20 minutes and reading the absorbance at 450 nm in an ELISA microplate reader (model LEX-808 IU). A unit of superoxide dismutase is defined as 50% inhibition of formazan at 450 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Fruit production. The number of fruits per plant (FPP) and fruit weight per plant (FWPP) showed no significant differences ($P \leq 0.05$) between the treatments (Table 1). These results agree with those of Becvort-Azcurra *et al.* (2012), who applied 2.5 and 5 mg L⁻¹ of selenium in tomato plants grown in perlite substrates and soil and found no significant differences in fruit production, and those of Yang *et al.* (2003), who recorded a non-significant effect of selenium application on soybean yield. There are reports, however, about the positive effects of the addition of selenium to horticultural crop species, such as that by Germ *et al.* (2005), who found this effect on the biomass of

Cucurbita pepo fruits. Meanwhile, Nancy *et al.* (2014) showed that tomato fruit yield and quality were higher with increasing concentrations of selenium in soil, seed or foliar application (until a maximum of 10 mg L⁻¹). Other authors have also reported that Se increases the yield of rice (Wang *et al.*, 2013), lettuce (Xue *et al.*, 2001) and soybean (Djanaguiraman, 2004). Conversely, Yao *et al.* (2013) reported an increase in wheat yield by Se foliar application. The impact of selenium applications in the improvement of yield and quality of crops depends on several factors, such as soil texture, the physico-chemical characteristics, and the method and time of Se application (Lyons *et al.*, 2003). With respect to total dry matter (TDM) content, there was a significant difference ($P \leq 0.05$) between treatments in leaves but not in stems and fruits (Table 1). A similar behavior was reported by Becvort-Azcurra *et al.* (2012), who found no difference in the TDM of leaves, stems and fruits after the addition of Se in tomato plants.

Agronomic variables. The results for the agronomic variables are shown in Table 2. It can be observed that there were significant differences ($P \leq 0.05$) between treatments associated with the application of Se, with a significant increase in the values of stem length (SL), stem diameter (SD), fruit total soluble solids, firmness and diameter of fruits (PFD and EFD). The positive responses observed in the plants are consistent with the report by Hartikainen *et al.* (2000) when the Se concentration in *Lolium perenne* leaves was less than 10 mg kg⁻¹. They are also consistent with the reports by other authors about a positive effect of the addition of Se on species such as *Lolium perenne* (Hartikainen *et al.*, 2000), *Lactuca sativa* (Xue *et al.*, 2001) and *Solanum tuberosum* (Turakainen *et al.*, 2004).

Mineral nutrients. The concentration of selenium in leaves, stems and fruits, expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$, is shown in Figure 1. In the leaves and stems, both Se treatments were significantly different from the control ($P \leq 0.05$); however, in the fruits, the only difference was between 5 mg L^{-1} of Se and the control. The peak value in fruits was $35.8 \mu\text{g g}^{-1}$ when treated with 5 mg L^{-1} , resulting in 53.1% more selenium over the control plants, which is higher than that reported by Nancy *et al.* (2014) in tomato fruits ($29.5 \mu\text{g g}^{-1}$) developed with 10 mg L^{-1} sodium selenate through soil application and a rate accumulation of 52.5% over the control plants. Other reports have confirmed Se accumulation in wheat grains (Nawaz *et al.*, 2014) and rice grains (Boldrin *et al.*, 2013) obtained by Se fertigation and Se foliar application, respectively.

The effect of Se on plants depends mainly on its concentration. According to Hamilton (2004), Se has three levels of biological activity: 1) trace concentrations are required for normal growth and development; 2) moderate concentrations can be stored to maintain homeostatic functions; and 3) high concentrations may result in toxic effects. Studies on *Lolium perenne* and *Lactuca sativa* have shown that although Se is harmful to plants in high concentrations (>10 and 1.0 mg kg^{-1} , respectively), it could exert beneficial effects at low concentrations (Hartikainen *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2001). In this regard, Becvort-Azcurra *et al.* (2012) found toxic effects in tomato plants when applying 10 and 20 mg L^{-1} in the nutrient solution. Moreover, the values of the concentration of Se in leaves, stems and fruits under all the treatments applied in this study were higher than those reported by Becvort-Azcurra *et al.* (2012). It is possible that this difference is due to the use of soil and perlite as substrates by these authors, which most likely modified the availability of selenium. Furthermore, the values of Se in fruits of control plants

were high compared with those reported by Eurola *et al.* (1989) and by Becvort-Azcurra *et al.* (2012), who added Se to soil. As for the distribution of selenium in the plants, Kabata-Pendias and Pendias (2001) reported an uneven accumulation among the different organs; actively growing tissues usually contain higher amounts of Se, and many species of plants accumulate higher amounts of selenium in stems and leaves than in root tissues. Our results do not agree with the above because we obtained more selenium in the stems and lower concentrations in fruits and leaves (Figure 1). A similar result was reported by Arvy (1993) and Becvort-Azcurra *et al.* (2012), who found the highest concentrations of selenium in stems, followed by leaves and fruits. If only leaves and fruits are compared, a higher accumulation in fruits was obtained than in the control, whereas Nancy *et al.* (2014) reported higher values in the leaves.

The concentrations of macronutrient elements in the plant tissues are shown in Table 3. The macronutrients that showed significant differences ($P \leq 0.05$) between treatments were Mg in leaves and K in stems and fruits. Despite the above results, the Spearman coefficient showed no significant correlation ($P \leq 0.05$) between the concentration of Se and the rest of the mineral elements. This fact suggests that the presence of Se in the concentrations used in this study did not interfere with the absorption of other elements. This does not agree with Kabata-Pendias and Pendias (2001), who noted that higher levels of selenium in plants can suppress the concentration of N in tissues and can inhibit the absorption of some metals such as Mg. Meanwhile, Smoleń *et al.* (2014) reported a reduction in the levels of Ca and Mg in lettuce roots with the foliar application of Se and I, although they did not observe any difference in the content of macronutrients in leaves when applying Se individually. As for the correlation between Se concentrations in

different plant tissues, they were all positive and significant (leaf Se/stem Se, $R=0.50$; leaf Se/Fruit Se, $R=0.68$ fruit; stem Se/fruit Se, $R=0.59$), which suggests an absence of competition for Se between the different organs and an accumulation of Se by the organs in direct proportion to its availability.

Activity of antioxidant proteins. The results for the activities of catalase and glutathione peroxidase are shown in Figures 2 and 3, respectively. Both cases show a similar behavior in which enzyme activity shows a tendency to grow in treatments with Se, but the only significant change is in enzyme activity of fruits when 5 mg L^{-1} of Se was applied. Regarding the antioxidant activity, recent investigations have shown that selenium not only promotes plant growth and development but also decreases senescence, increases antioxidant enzyme activity (Xue *et al.*, 2001; Djanaguiraman *et al.*, 2005; Saidi *et al.*, 2014, Nawaz *et al.*, 2014) and increases resistance and antioxidant capacity under various types of stress (Peng *et al.*, 2002; Djanaguiraman *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2013).

The results for catalase (CAT) activity are shown in Figure 2. Similarly, Nowak *et al.* (2004) found significantly enhanced activity in redox enzymes, particularly in catalase, in response to several concentrations of Se added in wheat plants, and Saidi *et al.* (2014) demonstrated a positive change in the activities of catalase in response to the addition of selenium in sunflower.

The glutathione peroxidase (GSH-Px) enzyme showed a positive behavior similar to CAT (Figure 3). Some studies have reported the decrease in H_2O_2 levels due to the reactivation of antioxidants by proper doses of selenium, particularly of H_2O_2 -quenchers such as GSH-Px (Filek *et al.*, 2009 and Kumar *et al.*, 2012). Hartikainen *et al.* (2000)

showed that cellular antioxidant activity is associated with an increase in GSH-Px activity and that the latter is positively related to the concentration of Se in plant tissue. Cartes *et al.* (2005) demonstrated that selenite was more efficient than selenate as an inducer of GSH-Px activity in *Lolium perenne*, and in *Senecio scaberrimus* L. both selenite and selenate induced an increase in GSH-Px activity (Paciolla *et al.*, 2011).

The percentage of superoxide dismutase (SOD) activity is shown in Figure 4. Despite an increasing trend observed in SOD activity in leaves and fruits after applying Se, only one significant result was obtained in fruits. Xue *et al.* (2001) observed an increase in SOD activity in senescent lettuce plants when adding Se; however, Saidi *et al.* (2014) observed decreased activity of SOD when applying selenium as pre-soaked in sunflower seeds. The difference with our results might indicate different responses to selenium, depending on the application form or the organ under study: fruits, leaves or stems.

It can be said that the applied doses of selenium were appropriate for generating an increase in enzyme activity, but this fact did not cause any stress conditions for the plant. In other cases, the increase in the activity of antioxidant enzymes responds to a stimulus stress, as occurred with those reported by Valizadeh *et al.* (2013), who noted a significant increase in activity of SOD and different POX isoenzymes under salt stress on alfalfa (*Medicago sativa* L.), and Abbasi *et al.* (2014) found that CAT and GPX activity increased in some genotypes of common vetch (*Vicia sativa* L.) under drought stress.

CONCLUSIONS

The variables of growth, plant height, stem diameter, fruit firmness and total solids of fruits responded positively to the application of selenium, whereas this application caused no interference with the absorption of N, P, K, Ca and Mg. The addition of selenium in the nutrient solution significantly increased the concentration of this element in plants; the 5 mg L⁻¹ treatment allowed the doubling of the concentration of this element in fruits compared with the control treatment. This concentration of selenium in fruits was positively correlated with the concentration in leaves and stems. Moreover, the Se resulted in an increased enzyme activity of catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fruits, although analyses of the markers of oxidative stress such as hydrogen peroxide and/or lipid peroxidation are necessary for better understanding this antioxidative picture.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author Castillo-Godina thanks CONACYT for the financial support.

REFERENCES

Abbasi, A. R., Sarvestani, R., Mohammadi, B. and Bagheri, A. 2014. Drought Stress-Induced Changes at Physiological and Biochemical Levels in Some Common Vetch (*Vicia sativa* L.) Genotypes. *J. Agr. Sci. Tech.*, **16**: 505-516.

- A. O. A. C. 1980. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 13th Ed. Washington, DC. USA, 1038pp.
- A. O. A. C. 2000. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 17th Ed. Gaithersburg, MD. USA, 2000pp.
- Arthur, J. R. 2003. Selenium Supplementation: Does Soil Supplementation Help and Why?. *Proc. Nutr. Soc.*, **62**: 393-397.
- Arvy, M. P. 1993. Selenate and Selenite Uptake and Translocation in Bean Plants (*Phaseolus vulgaris*). *J. Exp. Bot.*, **44**: 1083-1087.
- Becvort-Azcurra, A., Fuentes-Lara, L. O., Benavides-Mendoza, A., Ramírez, H., Robledo-Torres, V. and Rodríguez-Mendoza, M. de las N. 2012. Aplicación de Selenio en Tomate: Crecimiento, Productividad y Estado Antioxidante del Fruto. *Terra Latinoamericana*, **30**: 291-301.
- Boldrin, P. F., Faquin, V., Ramos, S. J., Boldrin, K. V. F., Avila, F. W., Guilherme, L. R. G. 2013. Soil and Foliar Application of Selenium in Rice Biofortification. *J. Food Compos. Anal.*, **31**: 238-244.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- Broadley, M. R., White, P. J., Bryson, R. J., Meacham, M. C., Bowen, H. C., Johnson, S. E., Hawkesford, M. J., Mc Grath, S. P., Zhao, F. J., Breward, N., Harriman, M. and Tucker, M. 2006. Biofortification of UK Food Crops with Selenium. *Proc. Nutr. Soc.*, **65**: 169-181.

- Cartes, P., Gianfreda, L. and Mora, M. L. 2005. Uptake of Selenium and its Antioxidant Activity in Ryegrass When Applied as Selenate and Selenite Forms. *Plant Soil*, **276**: 359-367.
- Cartes, P., Shene, C. and Mora, M. 2006. Selenium Distribution in Ryegrass and its Antioxidant Role as Affected by Sulfur Fertilization. *Plant Soil*, **285**: 187-195.
- Combs, G. F. Jr. 2001. Selenium in Global Food Systems. *Brit. J. Nutr.*, **85**: 17-547.
- De Souza, M. P., Pilon-Smits, E. A. H., Lytle, C. M., Hwang, S., Tai, J., Honma, T. S., Yeh, L. and Terry, N. 1998. Rate-limiting Steps in Selenium Assimilation and Volatilization by Indian Mustard. *Plant Physiol.*, **117**: 1487-1494.
- Djanaguiraman, M. D., Devi, A. K., Shanker, A., Annie Sheeba, J., Bangarusamy, U. 2004. Impact of Selenium Spray on Monocarpic Senescence of Soybean (*Glycine max* L.). *Food Agri. Environ.*, **2**: 44-47.
- Djanaguiraman, M., Devi, D. D., Shanker, A. K., Sheeba, A. and Bangarusamy, U. 2005. Selenium-an Antioxidative Protectant in Soybean During Senescence. *Plant Soil*, **272**: 77-86.
- Eurola, M., Ekholm, P., Ylinen, M., Koivistoinen, P. and Varo, P. 1989. Effects of Selenium Fertilization on the Selenium Content of Selected Finnish Fruits and Vegetables. *Acta Agr. Scand.*, **39**: 345-350.
- Feng, R., Chaoyang, W. and Tu, S. 2013. The Roles of Selenium in Protecting Plants Against Abiotic Stresses. *Environ. Exp. Bot.*, **87** :58-68.
- Filek, M., Zembala, M., Hartikainen, H., Miszalski, Z., Korna's, A., Wietecka-Posluszny, R., Walas, P. 2009. Changes in Wheat Plastid Membrane Properties Induced

- by Cadmium and Selenium in Presence/Absence of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *Plant Cell Tiss. Org.*, **96**: 19-28.
- Germ, M., Kreft, I. and Osvald, J. 2005. Influence of UV-B Exclusion and Selenium Treatment on Photochemical Efficiency of Photosystem II, Yield and Respiratory Potential in Pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiol. Bioch.*, **43**: 445-448.
- Hamilton, S. J. 2004. Review of Selenium Toxicity in the Aquatic Food Chain. *Sci. Total Environ.*, **326**: 1-31.
- Harris, W. D. and Papat, P. 1954. Determination of the Phosphorus Content of Lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**: 124-127.
- Hartikainen, H., Xue, T. and Piironen, V. 2000. Selenium as an Antioxidant and Pro-oxidant in Ryegrass. *Plant Soil*, **225**: 193-200.
- Kabata-Pendias, A. and Pendias H. 2001. Trace Elements in Soils and Plants, 3rd Edition, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, 403pp.
- Kumar, M., Bijoy, A. J., Baghel, R. S., Reddy, C. R. K., Jha, B. 2012. Selenium and Spermine Alleviates Cadmium Induced Toxicity in the Red Seaweed *Gracilariadura* by Regulating Antioxidant System and DNA Methylation. *Plant Physiol. Bioch.*, **51**: 129-138.
- Lin, L., Zhou, W., Dai, H., Cao, F., Zhang, G., Wu, F. 2012. Selenium Reduces Cadmium Uptake and Mitigates Cadmium Toxicity in Rice. *J. Hazard. Mater.*, **235**: 343-351.
- Lubinsky, S. and Bewley, G. C. 1979. Genetics of Catalase in *Drosophila melanogaster*: Rates of Synthesis and Degradation of the Enzyme in Flies Aneuploid and Euploid for the Structural Gene. *Genetics*, **91**: 723-742.

- Lyons, G., Stangoulis, J., Graham, R. 2003. High-selenium Wheat: Biofortification for Better Health. *Nutr. Res. Rev.*, **16**: 45-60.
- Nancy, D. and Arulselvi, P. I. 2014. Effect of Selenium Fortification on Biochemical Activities of Tomato (*Solanum lycopersicum*) Plants. *Indo Am. J. Pharm. Res.*, **4**: 3997-4005.
- Nawaz, F, Ashraf, M. Y., Ahmad, R., Waraich, E. A., Shabbir, R. N., Bukhari, M. A. 2014. Supplemental Selenium Improves Wheat Grain Yield and Quality Through Alterations in Biochemical Processes Under Normal and Water Deficit Conditions. *Food Chem.*, **175**: 350-357.
- Nowak, J., kaklewski, K. and Ligocki, M. 2004. Influence of Selenium on Oxidoreductive Enzymes Activity in Soil and in Plants. *Soil Biol. Biochem.*, **36**: 1553-1558.
- Paciolla C., De Leonardis, S. and Dipierro, S. 2011. Effects of Selenite and Selenate on the Antioxidant Systems in *Senecio scandens* L. *Plant Biosyst.*, **145**: 253-259.
- Peng, X. L., Liu, Y. Y. and Luo, S. G. 2002. Effects of Selenium on Lipid Peroxidation and Oxidizing Ability of Rice Roots Under Ferrous Stress. *J. Northeast Agric. Univ.*, **19**: 9-15.
- Preciado-Rangel, P., Favela-Chavez, E. and Benavides-Mendoza, A. 2006. *Manual para la Preparación de Soluciones Nutritivas*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México, 146pp.
- Sahnoun, Z., Jamoussie, K. and Zegal, K. M. 1997. Free Radicals and Antioxidants: Human Physiology and Therapeutic Aspects. *Therapie*, **52**: 251-70.

- Saidi, I., Chtourou, Y. and Djebali, W. 2014. Selenium Alleviates Cadmium Toxicity by Preventing Oxidative Stress in Sunflower (*Helianthus annuus*) Seedlings. *J. Plant Physiol.*, **171**: 85-91.
- Smoleń, S., Kowalska, I. and Sady, W. 2014. Assessment of Biofortification With Iodine and Selenium of Lettuce Cultivated in the NFT Hydroponic System. *Sci. Hort.*, **166**: 9-16.
- Steiner, A. A. 1961. A Universal Method for Preparing Nutrient Solutions of a Certain Desired Composition. *Plant Soil*, **15**: 134-154.
- Terry, N., Zayed, A. M., De Souza, M. P. and Tarun, A. S. 2000. Selenium in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**: 401-432.
- Turakainen, M., Hartikainen, H. and Seppänen, M. M. 2004. Effects of Selenium Treatments on Potato (*Solanum tuberosum* L.) Growth and Concentrations of Soluble Sugars and Starch. *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 5378-5382.
- Valizadeh, M., Moharamnejad, S., Ahmadi, M. and Mohammadzadeh jalaly, H. 2013. Changes in Activity Profile of Some Antioxidant Enzymes in Alfalfa Half-sib Families Under Salt Stress. *J. Agr. Sci. Tech.*, **15**: 801-809.
- Wang, Yu-Dong., Wang, X., Wong, Y. 2013. Generation of Selenium-enriched Rice with Enhanced Grain Yield, Selenium Content and Bioavailability through Fertilisation with Selenite. *Food Chem.*, **141**: 2385-2393.
- White, P. J., Bowen, H. C., Parmaguru, P., Fritz, M. and Spracklen, W. P. 2004. Interactions Between Selenium and Sulphur Nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, **55**: 1927-1937.

Xue, T., Hartikainen, H. and Piironen, V. 2001. Antioxidative and Growth-promoting Effect of Selenium in Senescing Lettuce. *Plant Soil*, **27**: 55-61.

Yang, F., Chen, L., Hu, Q., Pan, G. 2003. Effect of the Application of Selenium on Selenium Content of Soybean and its Products. *Biol. Trace Elem. Res.*, **93**: 249-256.

Yao, X., Jianzhou, C., Xueli, H., Binbin, L., Jingmin, L., Zhaowei, Y. 2013. Effects of Selenium on Agronomical Characters of Winter Wheat Exposed to Enhanced Ultraviolet-B. *Ecotox. Environ. Safe.*, **92**: 320-326.

Zhao, X. Q., Mitani, N., Yamaji, N., Shen, R. F. and Ma, J. F. 2010. Involvement of Silicon Influx Transporter OsNIP2;1 in Selenite Uptake in Rice. *Plant Physiol.*, **153**: 1871-1877.

Table 1. Comparison of means of total dry matter (TDM), number of fruits per plant (FPP) and fruit weight per plant (FWPP), evaluated on three sampling dates in tomato plants with applications of selenium in nutrient solution at three different concentrations: 0, 2 and 5 mg L⁻¹.

Treatments	TDM (%)			FPP (No)	FWPP (g)
	leaf	stem	fruit		
Control	43.7 b*	26.6 a	32.8 a	10.8 a	860.1 a
2 mg/L	48.1 ab	28.3 a	28.9 a	13.0 a	1049.3 a
5 mg /L	50.9 a	29.9 a	30.0 a	13.9 a	1147.1 a

* Mean values with different superscript letters in the same column differ significantly according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).

Table 2. Comparison of means of the agronomic variables evaluated on three sampling dates in tomato plants with applications of selenium in nutrient solution at three different concentrations: 0, 2 and 5 mg L⁻¹.

Treatments	SL	SD	PDF	EDF	Fruit firmness	Total Soluble Solids of Fruits
	cm	mm	cm	cm	kg cm ⁻²	°Bx
Control	61.1 b*	11.8 b	5.49b	5.42b	2.9 c	4.3 b
2 mg/l	67.5 a	13.4 a	6.24a	5.93a	4.3 b	5.1 a
5 mg/l	65.2 a	13.3 a	6.38a	5.96a	4.5 a	4.9 a

* Mean values with different superscript letters in the same column differ significantly according to Tukey's test ($P \leq 0.05$). SL = stem length; SD = stem diameter; PFD = polar diameter of fruits; EFD= equatorial diameter of fruits.

Table 3. Concentration of macronutrients elements and selenium in the different organs of tomato with selenium application in nutrient solution at three different concentrations 0, 2 and 5 mg L⁻¹. Concentrations of N, P, K, Ca and Mg are given in percentage, the selenium in µg g⁻¹.

Plant organs	Se (mg L ⁻¹)	N	P	K	Ca	Mg	Se
Leaves	0	3.36a*	0.76a	3.57a	5.16a	0.58c	9.90b
	2	3.24a	0.82a	4.42a	4.72a	0.68b	20.9a
	5	3.09a	0.91a	3.47a	3.54a	0.71a	20.4a
Stems	0	2.36a	0.70a	3.84ab	3.30a	0.49a	21.7b
	2	2.50a	0.77a	4.47a	3.90a	0.31a	45.6a
	5	2.49a	0.72a	3.40b	2.82a	0.37a	52.3a
Fruits	0	2.20a	0.59a	2.95ab	0.86a	0.40a	16.8b
	2	1.87a	0.47a	3.44a	1.26a	0.34a	24.5ab
	5	2.11a	0.56a	2.90b	2.82a	0.33a	35.8a

* Mean values with different superscript letters in the same column differ significantly according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).

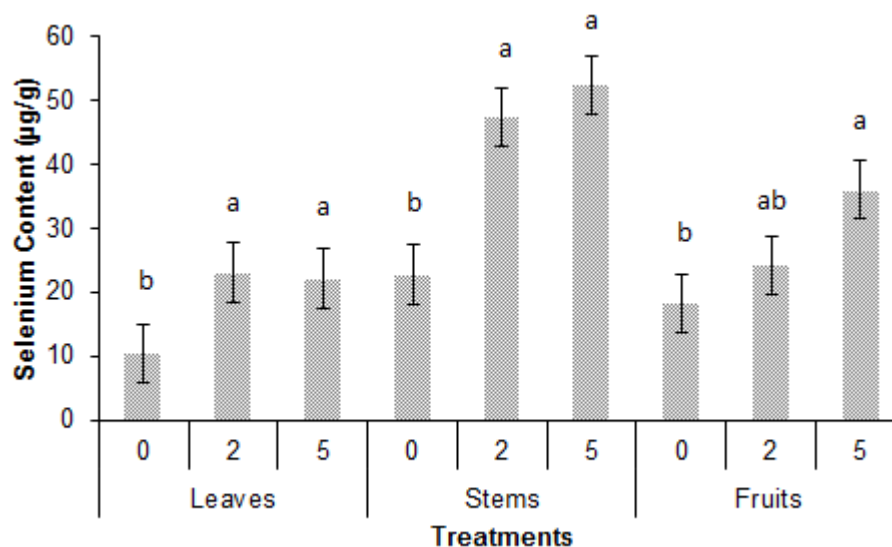


Fig. 1. Selenium concentration in tomato leaves, stems and fruits with applications of selenium in nutrient solution; the concentrations used are indicated on the x axis (0, 2

and 5 mg L⁻¹). Means with different label letter differ significantly according to Tukey's test ($P \leq 0.05$). The mean tests were applied independently to each plant organ.

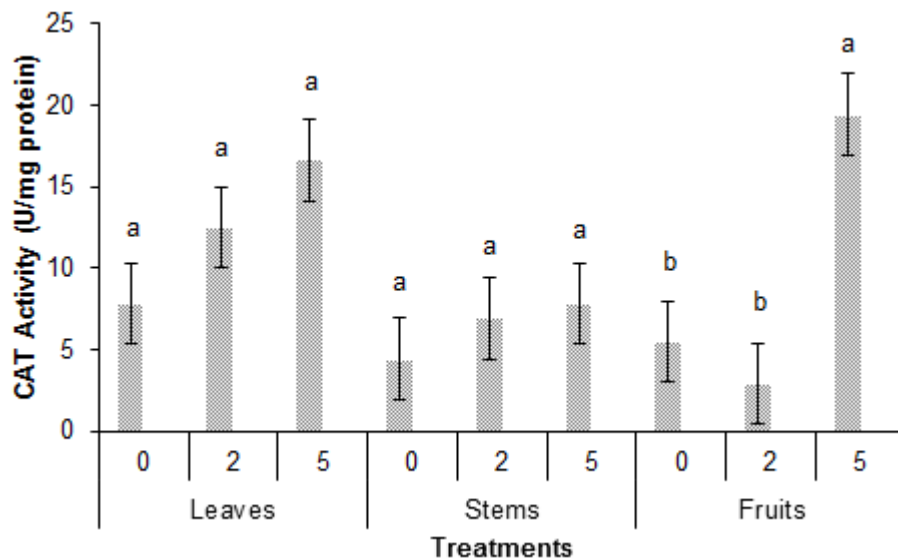


Fig. 2. Catalase enzyme activity in tomato leaves, stems and fruits with application of 0, 2 and 5 mg L⁻¹ of selenium. Means with different label letter differ significantly according to Tukey's test ($P \leq 0.05$). The mean tests were applied independently to each plant organ.

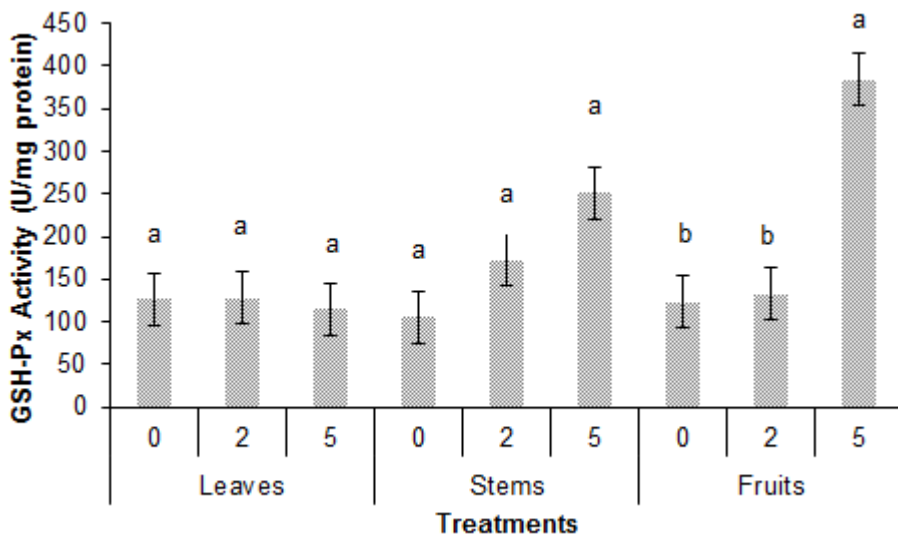


Fig. 3. Glutathione peroxidase enzyme activity in tomato leaves, stems and fruits with application of 0, 2 and 5 mg L⁻¹ of selenium. Means with different label letter differ significantly according to Tukey's test ($P \leq 0.05$). The mean tests were applied independently to each plant organ.

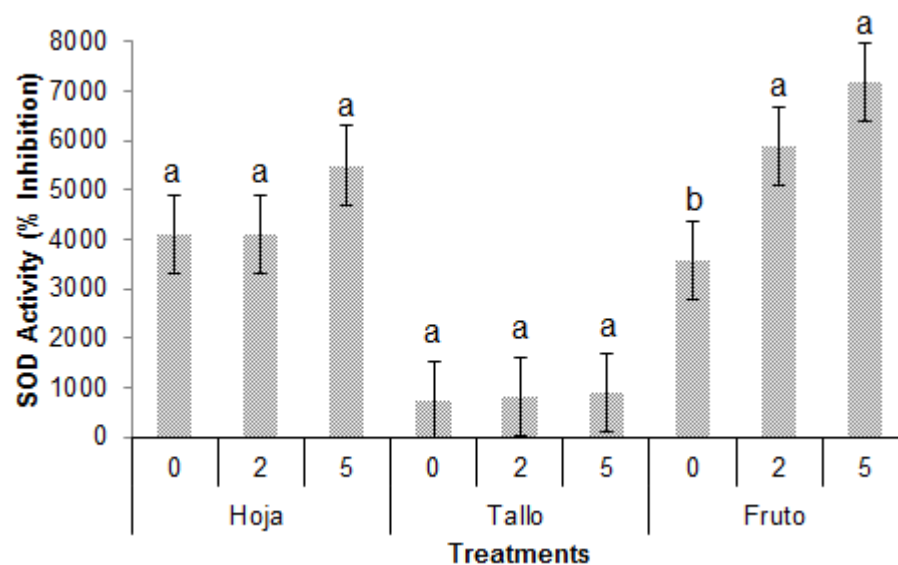


Fig. 4. Superoxide dismutase enzyme activity in tomato leaves, stems and fruits with application of 0, 2 and 5 mg L⁻¹ of selenium. Means with different label letter differ significantly according to Tukey's test ($P \leq 0.05$). The mean tests were applied independently to each plant organ.

Submission Confirmation



Thank you for your submission

Submitted to CyTA - Journal of Food

Manuscript ID TCYT-2015-0264

Title EFFECTS OF SELENIUM SUPPLEMENTATION ON ANTIOXIDANT METABOLISM
OF TOMATO FRUIT

Authors Castillo-Godina, Rocio
Foroughbakhch-Pournavab, Rahim
González-Morales, Susana
Benavides-Mendoza, Adalberto

Date Submitted 14-Nov-2015

**EFFECTS OF SELENIUM SUPPLEMENTATION ON ANTIOXIDANT
METABOLISM OF TOMATO FRUIT**

**EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN DE SELENIO EN EL METABOLISMO
ANTIOXIDANTE DEL FRUTO DE TOMATE**

**R.G. Castillo-Godina¹, R. Foroughbakhch-Pournavab¹, S. González-
Morales² & A. Benavides-Mendoza^{3*}**

¹Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas, Ave. Pedro de Alba s/n cruz con Ave. Manuel L. Barragán, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 66451, México, (52)18112448666, Email: rociogcg@hotmail.com y rahimforo@hotmail.com. ²Cátedras CONACYT, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura, Saltillo, Coahuila, 25315, México, (52)8444110303, Email: sgonzalezmo@conacyt.mx. ³Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Horticultura, Saltillo, Coahuila, 25315, México, (52)8444110303, Email: abenmen@uaaan.mx.

Corresponding author: A. Benavides-Mendoza, e-mail. abenmen@uaaan.mx; Phone (52)8444110303.

ABSTRACT

Selenium promotes plant growth by impacting antioxidant metabolism. Tomato plants were irrigated with 0, 2 and 5 mg L⁻¹ of Se as sodium selenite, and the production of fruits per plant and their sensory qualities were determined. The

concentration of Se, the activity of specific antioxidants, such as catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, ascorbic acid and lycopene, and the expression of the genes *cat*, *gpx*, *sod*, *apx* and *lic* was measured. The results showed that the Se concentration was 53.1% higher in fruits exposed to 5 mg L⁻¹, with higher values of ascorbic acid and lycopene, and they had 60.9, 33.4 and 26.0% higher enzymatic activities of CAT, GPX and SOD, respectively. These changes were accompanied by greater firmness and total dissolved solids, without changing the production of fruits per plant. In contrast, overexpression was observed in the genes *gpx*, *sod* and *apx* with 2 mg L⁻¹ of Se.

Keywords: tomato fruit; sodium selenite; redox; gene expression; ascorbic acid; lycopene.

RESUMEN

El selenio promueve el crecimiento de plantas al impactar el metabolismo antioxidante. Las plantas de tomate fueron irrigadas con 0, 2 y 5 mg L⁻¹ de Se en forma de selenito de sodio, y la producción de frutos por planta y sus cualidades sensoriales fueron determinadas. Se midió la concentración de Se y la actividad de antioxidantes específicos, catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, ácido ascórbico y el licopeno, así como la expresión de los genes *cat*, *gpx*, *sod*, *apx* y *lic*. Los resultados mostraron que la concentración de Se fue 53.1% mayor en los frutos expuestos a 5 mg L⁻¹, con valores más altos de ácido ascórbico y licopeno, y 50.8, 33.4 y 26.0% mayor

actividad enzimática de CAT, SOD y GPX, respectivamente. Estos cambios fueron acompañados por una mayor firmeza y sólidos disueltos totales, sin cambiar la producción de frutos por planta. En contraste, se observó sobreexpresión en los genes *gpx*, *sod* y *apx* con 2 mg L⁻¹ de Se.

Palabras clave: fruto de tomate; selenito de sodio; redox; expresión génica; ácido ascórbico; licopeno.

INTRODUCTION

Selenium is a micronutrient that is considered nonessential for plants (Zhang et al., 2010) but that in low concentrations is capable of promoting plant growth by positively impacting antioxidant metabolism (Van Hoewyk et al., 2008). Generally selenium is considered to be related to the antioxidant metabolism (Rayman, 2008) and it is known that selenite induces this activity more effectively than selenate (Cartes, Gianfreda, & Mora, 2005). Because Se is an essential element for humans, the accumulation of selenium in plants has an impact on their nutritional quality (Rayman, 2002). Selenium accumulation in different organs of the tomato plant was studied by Pezzarossa, Rosellini, Malorgio, Borghesi, and Tonutti (2013), who indicated that the selenium added in a nutrient solution was largely concentrated in the basal part of the plant, with the lowest concentration toward its apical portion. As for the fruits, these authors, Lee, Kang, Kim, Kim, and Kim (2007) and Becvort-Azcurra et al. (2012) reported that in tomato, the greater the amount of selenium added, the greater its accumulation in the fruits. Furthermore, Lee et al. (2007) and Nancy et al.

(2014) found increased growth of the tomato plants when applying selenium, as well as an increase in fruit production. The application of Se in crops also has a positive effect on antioxidant activity, as demonstrated in tomato (Lee et al., 2007; Becvort-Azcurra et al., 2012; Schiavon et al., 2013; Nancy et al., 2014), arabidopsis (Sams, Panthee, Charron, Kopsell, & Yuan, 2011), wheat (Nowak, kaklewski, & Ligocki, 2004), and lettuce (Xue, Hartikainen, & Piironen, 2001; Ríos et al., 2009).

Different studies in arabidopsis have shown that selenium induces changes in gene expression related to secondary metabolism and, in general, stress tolerance (Van Hoewyk et al., 2008; Sams et al., 2011). In tomato, a species classified as a non-accumulator of selenium (White et al., 2004), the studies conducted to date mainly concern the biochemical and metabolic changes that occur when exposing plants to this element (Schiavon et al., 2013) as well as the creation of transgenic Se-accumulating plants (Brummell et al., 2011); there is less information about differential gene expression responses after the application of Se as a fertilizer.

The overall objective of this study was to document changes in fruit production and the quality of tomato *Lycopersicon esculentum* L. (Mill.) as a result of adding sodium selenite in the irrigation solution. The specific objectives were (1) to quantify Se accumulation in these fruits, (2) to measure the concentration of ascorbic acid and lycopene, (3) to determine the specific activity of the antioxidant enzymes catalase, glutathione peroxidase (GPX), and

superoxide dismutase (SOD), and (4) to determine the changes in fruit gene expression of the *cat*, *gpx*, *sod*, *apx* and *lic* genes related to antioxidant metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Plant cultivation. The experiment was conducted at the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro facilities located in Saltillo, Mexico, with a warm semiarid climate, dry climate type according to the Köppen classification. Tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) "Toro" hybrid saladette seeds with determinate growth were sown in 200-well polystyrene trays. After 40 days, the seedlings were transplanted into 20-L pots using peat moss and perlite as a substrate in a 70:30 ratio. The maximum irradiance in the work area was 800 W m⁻², and thus, a black shade mesh was placed that provided 50% shade. The crop nutrition was maintained by applying Steiner universal nutrient solution (Steiner, 1961), adjusted to a pH of 6.0 to 6.5 with sulfuric acid, primarily to ensure the availability of mineral elements in the nutrient solution and to keep part of the selenite ion in its protonated form (Preciado-Rangel et al., 2006). The concentration of the nutrient solution applied was according to the phenological stage. The following treatments were applied to the plants: irrigation with nutrient solution (Steiner, 1961) for the control and irrigation with the same nutrient solution adding 2 and 5 mg L⁻¹ of selenium using reagent grade anhydrous sodium selenite (Na₂SeO₃, Sigma-Aldrich) as the source. Pruning of lateral buds

and trellising of plants were performed every eight days, as well as control of pests and diseases according to need.

Obtaining fruits. Samples for evaluation were obtained from a sampling conducted 120 days after transplanting. A maturity rating scale was used when collecting the fruits, based on US standards for fresh tomato coloration, selecting those called "red" (those with over 90% of the surface red in color) (United States Department of Agriculture [USDA], 1997). Based on the classification above, three mature red fruits were collected from each of the three randomly selected plants from each of the three treatments (0, 2, and 5 mg of Se L⁻¹). This collection was made for each of the various analyses performed in the laboratory: 1. Accumulation of selenium. 2. Total protein and specific enzymatic activity (CAT, GPX, and SOD). 3. Quantification of ascorbic acid. 4. Quantification of lycopene. 5. Determination of changes in the expression of the genes *cat*, *gpx*, *sod*, *apx* and *lic*. The collected fruits were processed and stored differently for each laboratory analysis, as specified in each section of this methodology.

Fruit production. The number of fruits per plant (FP) was obtained by harvesting the fruits from each of eight randomly selected plants per treatment; these plants were labeled for that purpose from the beginning of the study. Three harvests were made in three consecutive weeks (106, 113, and 120 days after treatment - DAT); for each, all-existing mature fruits were obtained on the harvest date. The weights of the fruits were measured to obtain the production of fruit per plant (Yield) in g plant⁻¹.

Accumulation of selenium in the fruit. The fresh harvested fruits were cut into slices, placed on aluminum trays and dried in a dehydrating oven (Lindberg/Blue M, Gravity Oven model) at a temperature of 60 °C for 48 hours. The dehydrated fruit was macerated in a porcelain mortar, and a 5 g portion of the dried material was obtained. A total of 1 g of the macerated material was taken, and this sample was subjected to acid digestion with nitric and perchloric acid in a ratio of 3:1, using a hot plate at 100 °C. The solution obtained was filtered with Whatman filter paper (No. 42 ashless) and diluted to a working solution of 100 mL with deionized water. The reading was performed using an inductively coupled plasma spectrometer (ICP Thermo Jarell Ash, Iris Advantage model), following the 984.27 procedure of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000).

Fruit quality. In fruits collected for the FP and fruit weight per plant (Yield), the polar and equatorial diameters (PD and ED) were measured using a simple vernier caliper (Autotec, 150mm Digital Caliper model); the firmness was measured in these fruits using a manual penetrometer (QA Supplies, FT011 model). The total dissolved solids (TDS) were measured with a hand held refractometer (Atago Master Refractometer Automatic).

Extraction of proteins. To prepare the extracts of the collected fruits, 1 g of the inner part of the fresh fruit pulp was macerated in liquid nitrogen in a mortar with a pestle; 0.3 g of this macerated amount was taken, and 1.5 g mL⁻¹ of pH 7 sodium phosphate buffer was added under cold conditions. After vigorous

mixing using a vortex (Genie 1 Touch mixer SI-0136 model), the extract was sonicated (Branson 1510 Sonifier 1510R-DTH Model) for 10 min and subsequently centrifuged (Prism Labnet International Inc.) at 12,000 rpm for 10 minutes at 2 °C. The supernatant was collected and kept at -80 °C until further use (Nugroho et al., 2002).

The total proteins were quantified to determine the specific enzyme activity. A standard curve ($y=0.0005x+0.5251$, $R^2=0.9712$) was obtained using 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, and 700 ppm from a stock solution of bovine serum albumin (1000 ppm) as a reference, by adding 1 mL of Bradford reagent (Bradford, 1976), and using a blank with a pH 7 sodium phosphate buffer. To accomplish the quantification, 5 μ L of the above mentioned extract was taken and added to 250 μ L of Bradford reagent. The mixture was placed in each of the corresponding wells of an ELISA microplate, and the reading was performed on a BioTek ELx808 Absorbance Microplate Readers at an absorbance of 630 nm.

Catalase activity. The catalase activity was determined according to the modified protocol of Lubinsky and Bewley (1979). A total of 20 μ L of the protein extract was taken, and a 1:20 dilution was made with 380 μ L of pH 7 sodium phosphate buffer. A blank was prepared with 400 μ L of pH 7 sodium phosphate buffer, 150 μ L of H_2SO_4 (2%) and 2 μ L of H_2O_2 (30%). Time 0 (0 minutes, sample, H_2SO_4 and H_2O_2) and time 1 (1 minute of reaction) were determined with the 1:20 diluted sample; 2 μ L of H_2O_2 (30% w/w) was added and allowed to react for one minute under vigorous agitation, and then, 150 μ L of H_2SO_4 (2%) was added to stop the reaction. Time 0 was the same quantity of sample, 150

μL of H_2SO_4 (2%) and then 2 μL of H_2O_2 (30% w/w). The absorbances were measured at a wavelength of 275 nm and were made in a 10x10 mm quartz cell in a spectrophotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis) using the standard curve for H_2O_2 as a reference (0, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 100 mM). The linear equation generated was $y=0.0047x+0.0063$ with $R^2=0.9982$. A blank color which did not contain substrate was used to measure fruit extract absorbance and the reading of the blank color was subtracted from each of the samples. A unit of catalase is defined as 1 μmol of H_2O_2 $\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$.

GPX activity. The GPX activity was quantified using a modified method of Xue et al. (2001). A total of 0.2 mL of protein extract was taken, and 0.4 mL of L-glutathione reduced (0.1 mM) and 0.2 mL of pH 7 sodium and potassium phosphate buffer (0.067 M) were added. The mixture was incubated in a water bath at 25 °C for 5 minutes, and then, 0.2 mL of H_2O_2 (1.3 mM) was added to start the reaction. The reaction was held for 10 minutes and was stopped by adding 1 mL of trichloroacetic acid (1%). The mixture was placed in an ice bath for 30 minutes and then was centrifuged for 10 minutes at 3,000 rpm. A 0.48-mL sample of the supernatant was taken, to which 2.2 mL of Na_2HPO_4 (0.32 M) and 0.32 mL of dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (1.0 mM) were added for color development. After a five-minute incubation, the absorbance was measured at a wavelength of 412 nm with a UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific Genesys 10S) using a standard curve constructed with 0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.3 and 62.5 mU mL^{-1} of pure GPX enzyme from the Glutathione Peroxidase kit (GPx, Assay Science Cell Research Laboratories). The standard curve was

$y=0.0002x+0.0987$ ($R^2=0.9721$). A blank color, which did not contain reagent for color development, was used to measure fruit extract absorbance and the reading of the blank color was subtracted from each of the samples. A unit of GPX is defined as 1 mU GPX mL⁻¹ min⁻¹.

SOD activity. The same protein extract of the above enzyme activities were used with three replicates per treatment to measure SOD activity using the methodology described in the commercial SOD kit (SOD assay kit Sigma-Aldrich 19160). The SOD enzyme activity was determined by the percent activity of SOD inhibition shown by the formation of water-soluble formazan dye (WST-1 formazan) after incubating the mixtures at 37 °C for 20 minutes and measuring the absorbances at a wavelength of 450 nm in an ELISA microplate reader (IU LEX-808 model). According to the SOD kit methodology, three blanks were conducted: blank 1 contained ddH₂O (double distilled water), WST working solution and enzyme working solution, blank 2 contained sample solution, WST working solution and dilution buffer and blank 3 contained ddH₂O, WST working solution and dilution buffer. A unit of dismutase is defined as 50% SOD inhibition activity at 450 nm.

Ascorbic acid quantification. According to the AOAC (1990) method. A full slice was cut out of mature fresh fruit from each treatment; 10 g from the slice were placed in a porcelain mortar and crushed. Subsequently 10 mL of 2% hydrochloric acid was added, and the mixture was macerated for 10 minutes. The content was washed three times with distilled water by filtration, and the

filtrate was placed in a 100-mL volumetric flask. The remaining solid was washed again with distilled water and the filtrate transferred to the same 100-mL volumetric flask for its subsequent precise dilution. A total of 10 mL from this dilution was measured out and placed in a 125-mL Erlenmeyer flask and was titrated with a solution of 2,6-dichlorophenol-indophenol (redox indicator Sigma-Aldrich 33125) 0.001 N until the first pink tone lasting 30 seconds appeared. A blank of hydrochloric acid and distilled water was used.

Quantification of lycopene. The lycopene was quantified using a modification of the method of Bunghez et al. (2011). The quantification was carried out for 3 replicates per treatment. A random selection of mature fresh fruit was obtained, cut into slices, placed on aluminum trays and dried in a dehydrating oven at a temperature of 60 °C for 48 hours. The dehydrated tissue was pulverized in a mortar, and from this powder, a portion of 0.5 g was taken and mixed with 0.5 mL of sodium phosphate buffer (pH 7) and 2 mL of a hexane/acetone extraction mixture at a ratio of 2:3. The extract was centrifuged at 5,000 rpm for five minutes, and two phases were obtained. The organic phase was diluted with acetone in a 1:1 volume, and the absorbance was measured at a wavelength of 502 nm in a spectrophotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis) using as a reference a standard curve for lycopene (96% Lycopene Xian Lukee Bio-Tech Co., Ltd.) constructed with 0, 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, and 75 mg L⁻¹ from a stock solution of 100 mg L⁻¹ (consisting of a standard lycopene and an extractor mix hexane: acetone, 2:3 ratio). The linear equation was $y=0.0413x+0.0135$ ($R^2=0.9884$).

Analysis of gene expression in tomato fruit by semiquantitative PCR. RNA extraction was performed using the Trizol method (TRI Reagent, Sigma-Aldrich 93289). A total of 10 g of mature fresh fruit tissue of each treatment and replicate was ground in liquid nitrogen with mortar and pestle; in a 2 mL tube were added 100 mg of frozen tissue and 1 mL of TRI reagent was added and incubated for five minutes at room temperature. This was carried out in triplicate. Then, 200 μ L of chloroform was added and the mixture shaken vigorously; next, it was incubated for 15 minutes at room temperature and centrifuged at 12,000 g at 4 °C for 15 minutes. The supernatant was recovered, 500 μ L of cold isopropanol was added, and the mixture was incubated for 10 minutes at room temperature. It was then centrifuged at 12,000 g at 4 °C for 10 minutes. The resulting pellet was washed with 500 μ L of cold ethanol (70% v/v). The pellet was resuspended with 50 μ L of diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water (DNase, RNase and protease free) and stored at -70 °C. The amount (absorbance 260/280) and quality (denaturing electrophoresis) of the RNA obtained was determined (Chomczynski, P., 1993).

cDNA synthesis was performed using the ImProm II Reverse Transcription System commercial kit (Promega, A3800). Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the genes by using a thermocycler (Labnet, multigene gradient).

The characteristics of the primers used are shown in Table 1. Primer-BLAST tool was used to design primers. And these were synthesized by

Macrogen Inc. (Seoul, Korea, <http://www.macrogen.com>) The PCR products were separated by electrophoresis using a 3% agarose gel. They were made 3 loads per sample. Gel images were captured with a MultiDoc-It Digital Imaging System (UVP). The obtained bands were analyzed via image densitometry using ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Statistical analysis

A completely randomized design was used. An analysis of variance using the Statistical Analysis System (SAS) 9.1.3 software was performed, and a Tukey's range test ($\alpha \leq 0.05$) was used. For the relative density of the gene expression data, a Fisher's exact test for nonparametric comparison of means ($\alpha \leq 0.1$) was applied using Statistica software (version 6.0). Further, a rank correlation test (Spearman's rho) was applied to verify the statistical association between the agronomic variables measured, the biochemical variables, and the gene expression data.

RESULTS AND DISCUSSION

Fruit production. The number and weight of the fruits per plant were not affected by Se (Table 2). There have been reports of positive effects of the addition of selenium in vegetable crops (Germ, Kreft, & Osvald, 2005). Still, the specific effect on tomato fruit production appears to depend on the chemical form of Se applied, as Becvort-Azcurra et al. (2012) found no differences in production when applying sodium selenite and Pezzarossa et al. (2013) when

applying sodium selenate, also Carvalho, Gallardo-Williams, Benson, and Martin, (2003) found a negative effect when applying an organic source of Se.

Accumulation of selenium in the fruit. There was a gradual increase in the Se concentration in the fruit as the application of the element increased (Table 3), and it was found to be associated with the morphological and chemical characteristics of the fruit (Figure 1). The movement of Se from the roots to tomato fruits was also observed by Becvort-Azcurra et al. (2012) and Pezzarossa et al. (2013), who applied selenate and sodium selenite, respectively, reaching concentrations lower than those reported here. Successful selenium supplementation using fertilizers in bulb (Reilly et al., 2014) or tuberous crops (Poggi, Arcioni, Filippini, & Pifferi, 2000) indicates that the technique can be applied in almost any crop.

Fruit quality. The features of size (PD and ED), firmness, and fruit quality were positively affected by the selenium (Figure 1 and Table 3). Other studies have reported that Se induced positive changes in the concentration of antioxidants in tomato fruits without changing the solids content of the fruit (Becvort-Azcurra et al., 2012; Pezzarossa et al., 2013) or inducing an inducible change in the number or morphology of fruits (Carvalho et al., 2003).

Significant differences in the TDS and AA variables in the fruits were found. These positive changes in quality were accompanied by an increase in the concentration of lycopene when applying 5 mg L⁻¹ of Se (Table 3). This induction of non-enzymatic antioxidants was reported in other plant species like

lettuce when applying sodium selenate (Ríos et al, 2009) and in tomato by Lee et al. (2007) and Pezzarossa et al. (2013); the latter two coincided with increased lycopene in the fruit. To our knowledge, there is no information about the mechanism of action of Se on these variables of the fruit. The TDS of the fruit, which is mainly dependent on the sucrose contained in tissues, appears to represent a summary of the overall effect of the environment on the plant (Prado, 2002). Moreover, AA is derived from glucose and is one of the most significant non-enzymatic antioxidants, with reports that Se (Duma, Alsina, Dubova, Stroska, & Smiltina, 2011) and some growth regulators positively impact their concentration (Ramírez, Rivera-Cruz, Benavides-Mendoza, Robledo-Torres, & Reyna-Sustaita, 2010). Possibly, the effect of Se relates partly with an improvement in C economy, as demonstrated in *Solanum tuberosum*, which accumulated more carbohydrates and had a higher TDS when Se was applied (Turakainen, Hartikainen, & Seppänen, 2004).

Catalase activity. The activity of this enzyme showed a significant increase after applying 5 mg L⁻¹ of Se (Table 4). It has been shown that Se is associated with higher antioxidant activity in plants subjected to various types of stress (Djanaguiraman, Devi, Shanker, Sheeba, & Bangarusamy, 2005). The application of Se in wheat lead to increased activity of oxidoreductase enzymes, especially that of catalase (Nowak et al., 2004) and ascorbate peroxidase and glutathione reductase (Kaklewski, Nowak, & Ligocki, 2008), which are enzymes that are involved in the Halliwell-Asada cycle and, similar to catalase, cleave H₂O₂. While no complete explanation is available, the changes in enzyme

activity are assumed to occur in part from replacing S with Se in proteins (Valkama, Kivimaenpaa, Hartikainen, & Wulff, 2003).

GPX activity. Similar to catalase, the GPX activity showed a significant increase with the 5 mg L⁻¹ treatment (Table 4). Ríos et al. (2009) found the same results in GPX in lettuce plants treated with sodium selenite, as well as in another peroxidase, ascorbate peroxidase. This finding is consistent with those of other studies with the application of Se, in which an increase in GPX activity was observed (Hartikainen, Xue, & Piironen, 2000; Xue et al., 2001; Djanaguiraman et al., 2005; Ríos et al., 2009). Additionally, Cartes et al. (2005) showed that selenite is more efficient than selenate as an inducer of GPX activity.

SOD activity. The activity of this enzyme increased with both Se application treatments (Table 4). The SOD enzyme has the function of transforming the superoxide radical into H₂O₂ (Gratao, Polle, Lea, & Azevedo, 2005), such that its action is correlated with the action of the CAT enzyme (Ramírez-Serrano, Larrinaga-Mayoral, Murillo-Amador, Hernández-Saavedra, & Fujiyama, 2008). Ríos et al. (2009) also obtained higher SOD activity, reporting greater effectiveness of selenite over selenate in this response. Sreekala, Santosh, and Lalith (1999) also reported that the mitochondrial SOD activity increased with Se supplementation in *Trigonella foenum-graecum*.

Gene expression in tomato fruits. The relative expression levels of the genes of selected antioxidants (genes *cat*, *gpx*, *sod*, *apx* and *lic*) are noted in Figure 1. The control treatment was assigned a value of 1; the relative density values

greater than 1 are for those genes that were found to be over-expressed. This was the case for *gpx*, *sod* and *apx* with the application of 2 mg L⁻¹ of Se; in contrast, most genes with 5 mg L⁻¹ of Se were found to have values below 1. That is, they had a lower level of expression. The exception for this case was the *gpx* gene, which, though it showed a relative density value higher than 1 with 5 mg L⁻¹ of Se, it was not statistically significant.

It is known that in the fruit, the studied genes demonstrate controlled expression through development and maturation, as *cat* increases while *gpx* and *apx* decrease as the fruit ripens (Jimenez et al., 2002). In this study, the characterized fruits were all within the same stage of maturity and still showed strong differences, presumably associated with the presence of Se in different concentrations, in the expression of the *cat*, *gpx*, *sod*, *apx* and *lic* genes.

Through the differential expression of genes, cellular redox balance regulates different aspects of plant life, including development, adjustment to environmental factors, and defense against oxidative stress. This dynamic redox equilibrium depends on a fine balance between the amount of active oxygen species and the concentration of antioxidants (Gadjev et al., 2006). Applications of Se cause changes in the cellular redox equilibrium and, thus, change the level of expression of some genes, particularly those related to antioxidant metabolism (Van Hoewyk et al., 2008).

The levels of overexpression of the *cat*, *gpx*, *sod*, *apx* and *lic* genes only under the application of 2 mg L⁻¹ may indicate a hormesis-like phenomenon in

which the stimulus of expression depends on the concentration of Se applied (Calabrese & Baldwin 2002). Although it did not repress expression, the 5 mg L⁻¹ application generally caused a lower level of expression. This finding, associated with increased activity of antioxidant enzymes (Table 4), may indicate that in addition to the effect on gene expression at 2 mg L⁻¹, Se could also produce post-transcriptional changes in the activity of some of the enzymes in the case of treatment with 5 mg L⁻¹. It is known that one function of antioxidant enzymes in fruits is to regulate the rate of fruit ripening and to delay their senescence (Baquero, Castro, & Narváez, 2005); therefore, Se could be useful not only in manipulating nutritional quality as seen in Table 2 but possibly in post-harvest fruit ripening as well.

Correlation between the concentration of Se and fruit variables. Only two significant correlations with respect to the concentration of Se were found: the number of fruits per plant (FP) ($R = 0.9637$) and *cat* gene expression ($R = 0.9636$). All other variables showed no significant correlation.

CONCLUSIONS

The addition of sodium selenite did not influence the production of tomato fruit, but did lead to positive changes in the morphological (ED and PD) and quality characteristics (firmness and TDS). Although it was observed an upward trend (not statistically significant) on FP and Yield under the addition of treatments in comparison with the control, as perspective a relevant measurement of the

production of fruit on a larger scale could be carried out, because in the present work a fruit variety of determinate growth was used. The concentration of Se in the fruits was 53.1% higher with 5 mg L⁻¹ of Se compared to that of the control. The fruits of both Se application treatments showed increased accumulation of ascorbic acid and, in the case of treatment with 5 mg L⁻¹, 66.9% more lycopene. The antioxidant enzyme activities of CAT, GPX and SOD were also significantly increased (60.9, 33.4 and 26.0%, respectively) with the 5 mg L⁻¹ treatment. In contrast, the greatest levels of the *gpx*, *sod*, and *apx* gene transcripts occurred under the 2 mg L⁻¹ treatment. The rest of the transcripts were found in a lower level of relative density, this does not mean that they were repressed, but, for the expression of a gene with antioxidant activity, different processes occur before for example, induction of a signal, the translation process and the same regulation posttranscriptional. Therefore, and because an effect on all transcripts studied was observed, it can be concluded that the expression occurs at different times.

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

ACKNOWLEDGEMENTS

The author Castillo-Godina thanks CONACYT for the financial support.

REFERENCES

A.O.A.C. (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist* (15th ed.) (pp. 829-830). Washington, D.C. USA.

A.O.A.C. (2000). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (17th ed.) (pp. 2000). Gaithersburg, M.D. USA.

Baquero, D.E.L., Castro, R.J.A., & Narváez, C.C.E. (2005). Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): maduración y senescencia. *Acta Biológica Colombiana*, 10, 49–59.

Becvort-Azcurra, A., Fuentes-Lara, L.O., Benavides-Mendoza, A., Ramírez, H., Robledo-Torres, V., & Rodríguez-Mendoza, M. de las N. (2012). Aplicación de selenio en tomate: crecimiento, productividad y estado antioxidante del fruto. *Terra Latinoamericana*, 30, 291–301.

Brummell, D.A., Watson, L.M., Pathirana, R., Joyce, N.I., West, P.J., Hunter, D.A., & McKenzie, M.J. (2011). Biofortification of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit with the anticancer compound methylselenocysteine using a selenocysteine methyltransferase from a selenium hyperaccumulator. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10987–10994.

Bunghez, I.R., Raduly, M., Doncea, S., Aksahin, I., & Ion, R.M. (2011). Lycopene determination in tomatoes by different spectral techniques (uv-vis, ftir and hplc). *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures (DJNB)*, 6, 3.

Calabrese, E.J., & Baldwin, L.A. (2002). Defining hormesis. *Human and Experimental Toxicology*, 21, 91–97.

Cartes, P., Gianfreda, L., & Mora, M.L. (2005). Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenite and selenite forms. *Plant Soil*, 276, 359–367.

Carvalho, K.M., Gallardo-Williams, M.T., Benson, R.F., & Martin D.F. (2003). Effects of selenium supplementation on four agricultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 704–709.

Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15(3), 532-4.

Djanaguiraman, M., Devi, D.D., Shanker, A.K., Sheeba, A., & Bangarusamy, U. (2005). Selenium-an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant Soil*, 272, 77–86.

Duma, M., Alsina, I., Dubova, L., Stroska, L., & Smiltina, Z. (2011). The effect of sodium selenite and selenate on the quality of lettuce. In *Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology “Innovations for Food Science and Production” “FoodBalt”* (pp. 39–44). Latvia: University of Agriculture, Jelvaga.

Gadjev, I., Vanderauwera, S., Gechev, T., Laloi, C., Minkov, I.N., Shulaev, V., Apel, K., Inze, D., Mittler, R., & Van Breusegem, F. (2006). Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141, 436–445.

Germ, M., Kreft, I., & Osvald, J. (2005). Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficiency of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 445–448.

Gratao, P.L., Polle, A., Lea, P.J., & Azevedo, R.A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32, 481–494.

Hartikainen, H., Xue, T., & Piironen, V. (2000). Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant and Soil*, 225, 193–200.

Jimenez, A., Creissen, G., Kular, B., Firmin, J., Robinson, S., Verhoeven, M., & Mullineaux, P. (2002). Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta*, 214, 751–758.

Kaklewski, K., Nowak, J., & Ligocki, M. (2008). Effects of selenium content in green parts of plants on the amount of ATP and ascorbate–glutathione cycle enzyme activity at various growth stages of wheat and oilseed rape. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1011–1022.

Lee, G.J., Kang, B.K., Kim, T.I., Kim, T.J., & Kim, J.H. (2007). Effects of different selenium concentrations of the nutrient solution on the growth and quality of tomato fruit in hydroponics. *Acta Horticulturae*, 761, 443–448.

Nancy, D., & Arulselvi, P.I. (2014). Effect of selenium fortification on biochemical activities of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 4, 3997–4005.

Nowak, J., kaklewski, K., & Ligocki, M. (2004). Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 1553–1558.

Nugroho, L. H., Verberne, M. C., & Verpoorte, R. (2002). Activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in constitutively salicylic acid-producing tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(9), 755-760.

Pezzarossa, B., Rosellini, I., Malorgio, F., Borghesi, E., & Tonutti, P. (2013). Effects of selenium enrichment of tomato plants on ripe fruit metabolism and composition. *Acta Horticulturae*, 1012, 247–251.

Poggi, V., Arcioni, A., Filippini, P., & Pifferi, P.G. (2000). Foliar application of selenite and selenate to potato (*Solanum tuberosum*): effect of a ligand agent on selenium content of tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4749–4751.

Prado, J. L. (2002). Tipos y especificaciones de calidad en el cultivo del tomate. *Vida Rural*, 148, 9–14.

Ramírez, H., Rivera-Cruz, C.E., Benavidez-Mendoza, A., Robledo-Torres, V., & Reyna-Sustaita, G. (2010). Proheaxiona-Ca, una alternativa en la producción de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 16, 139–146.

Ramírez-Serrano, R., Larrinaga-Mayoral, J.A., Murillo-Amador, B., Hernández-Saavedra, N.Y., & Fujiyama, H. (2008). Antioxidant enzymatic response of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) under saline stress conditions. *Interciencia*, 33, 377–388.

Rayman, M.P. (2002). The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61, 203–215.

Rayman, M.P. (2008). Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *British Journal of Nutrition*, 100, 254–268.

Reilly, K., Valverde, J., Finn, L., Gaffney, M., Rai, D.K., & Brunton, N. (2014). A note on the effectiveness of selenium supplementation of Irish-grown *Allium* crops. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 53, 91–99.

Ríos, J.J., Blasco, B., Cervilla, L.M., Rosales, M.A., Sanchez-Rodriguez, E., Romero, L., & Ruiz, J.M. (2009). Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium. *Annals of Applied Biology*, 154, 107–116.

Sams, C.E., Panthee, D.R., Charron, C.S., Kopsell, D.A., & Yuan, J.S. (2011). Selenium regulates gene expression for glucosinolate and carotenoid biosynthesis in arabidopsis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136, 23–34.

Schiavon, M., Dall'acqua, S., Mietto, A., Pilon-Smits, E.A., Sambo, P., Masi, A., & Malagoli, M. (2013). Selenium fertilization alters the chemical composition and antioxidant constituents of tomato (*Solanum lycopersicon* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 10542–10554.

Sreekala, M., Santosh, T.R., & Lalith, K. (1999). Oxidative stress during selenium deficiency in seedlings of *Trigonella foenum-graecum* and mitigation by mirnosine. Part I. hydroperoxide metabolism. *Biological Trace Element Research*, 70, 193–207.

Turakainen, M., Hartikainen, H., & Seppänen, M.M. (2004). Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5378–5382.

U.S.D.A. (1997). United States Department of Agriculture. Agricultural marketing Service. United States standards for grades of fresh tomatoes. Retrieved from: <http://www.ams.usda.gov/AMSv1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5050331>.

Valkama, E., Kivimaenpaa, M., Hartikainen, H., & Wulff, A. (2003). The combined effects of enhanced UV-B radiation and selenium on growth, chlorophyll fluorescence and ultrastructure in strawberry (*Fragaria * ananassa*) and barley (*Hordeum vulgare*) treated in the field. *Agricultural and Forest Meteorology*, 120, 267–78.

Van Hoewyk, D., Takahashi, H., Inoue, E., Hess, A., Tamaoki, M., & Pilon-Smits, E.A. (2008). Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 132, 236–253.

White, P.J., Browen, H.C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spraclen, W.P., & Spiby, R.E. (2004). Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana* *Journal of Experimental Botany*, 55, 1927–1937.

Xue, T., Hartikainen, H., & Piironen, V. (2001). Antioxidative and growth-promoting effect of selenium in senescing lettuce. *Plant Soil*, 27, 55–61.

Zhang, Y., & Gladyshev, V.N. (2010). General trends in trace element utilization revealed by comparative genomic analyses of Co, Cu, Mo, Ni and Se. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 3393–3405.

Table 1. Characteristics of the Primers used for the quantification of gene expression.

Primer name	Sequences	Annealing temperature	Amplification product size
<i>cat</i> -f	5'- GGC CTG TTC TGC TTG AGG AT-3'	60 °C	170 pb
<i>cat</i> -r	5'- GCC AGG AGC TCG GAG AAA AT-3'		
<i>gpx</i> -f	5'- AGG ATG CTA AGG GCA AGG AC-3'	58 °C	169 pb
<i>gpx</i> -r	5'- TTG CAA GGG AGG GCC AGA AT-3'		

<i>sod-f</i>	5'- TGA TGA TGG GCC AAC TAC GG-3'	59 °C	175 pb
<i>sod-r</i>	5'- ACC CGC ATG ACG GAT TTC AT-3'		
<i>apx-f</i>	5'- TCT CCT CTC CTT CCC CAC AT-3'	60 °C	161 pb
<i>apx-r</i>	5'- GTG GCC TTC AAC AGC TCC TT-3'		
<i>lic-f</i>	5'- ACC CTG TTG GAA AAA GAT GGA T-3'	58 °C	151 pb
<i>lic-r</i>	5'- ACC CAA AGT TTC ACA AAA CTT CCT-3'		
<i>g3f-f</i>	5'- GGA GTC GAC CGG TGT TTT CA-3'	60 °C	190 pb
<i>g3f-r</i>	5'- GGG AGC AAG GCA ATT TGT GG-3'		

Table 2. Number of fruits per plant (FP) and the weight of fruits per plant (Yield) in tomato with application of selenium (0, 2 and 5 mg L⁻¹) via nutrient solution. The data correspond to three harvests obtained at 106, 113 and 120 DAT.

Treatments	FP (Fruits plant ⁻¹)	Yield (g plant ⁻¹)
0 mg L ⁻¹	12.00±2.9a	869.20±224.6a
2 mg L ⁻¹	17.67±3.9a	1061.53±349.8a
5 mg L ⁻¹	16.67±3.6a	1184.83±378.9a

FP: fruits per plant; Yield: weight of fruits per plant. Means followed by the same letter are not different according to Tukey's test ($\alpha \leq 0.05$).

Table 3. Morphological and chemical characteristics of tomato fruits from plants with application of selenium (0, 2 and 5 mg L⁻¹) via nutrient solution. Data correspond to fruits collected at 120 DAT.

Treatments	PD (cm)	ED (cm)	Firmness (kg cm ² ⁻¹)	TDS (%)	AA (mg AA 10g ⁻¹)	Lycopene (µg g ⁻¹)	Se concentration (µg g ⁻¹)
0 mg L ⁻¹	5.54±0.7b	5.28±0.5b	2.9±0.2c	4.3±0.1b	1.20±0.2b	13.81±2.4b	16.8±0.1b
2 mg L ⁻¹	6.40±0.5a	6.02±0.3a	4.3±0.3b	5.1±0.4a	2.82±0.1a	20.34±5.1b	24.5±0.1ab
5 mg L ⁻¹	6.36±0.4a	5.97±0.7a	4.5±0.3a	4.9±0.6a	2.41±0.1a	41.71±6.2a	35.8±0.1a

PD: polar diameter of the fruit, ED: equatorial diameter of the fruit, TDS: total dissolved solids, AA: ascorbic acid. Means followed by the same letter are not different according to Tukey's test ($\alpha \leq 0.05$).

Table 4. Activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) in fruits of tomato plants after SE application (0, 2 and 5 mg L⁻¹) via nutrient solution.

TREATMENT	CAT	GPX	SOD
Se	(U mg protein ⁻¹)	(U mg protein ⁻¹)	(% inhibition mg protein ⁻¹)
0 mg L ⁻¹	14.90±2.3b	84.57±3.4b	3880.00±70.7b
2 mg L ⁻¹	11.09±3.1b	53.87±2.2b	5526.67±40.2a
5 mg L ⁻¹	38.15±4.2a	126.91±10.5a	5240.00±40.5a

Means followed by the same letter are not different according to Tukey's test ($\alpha \leq 0.05$)

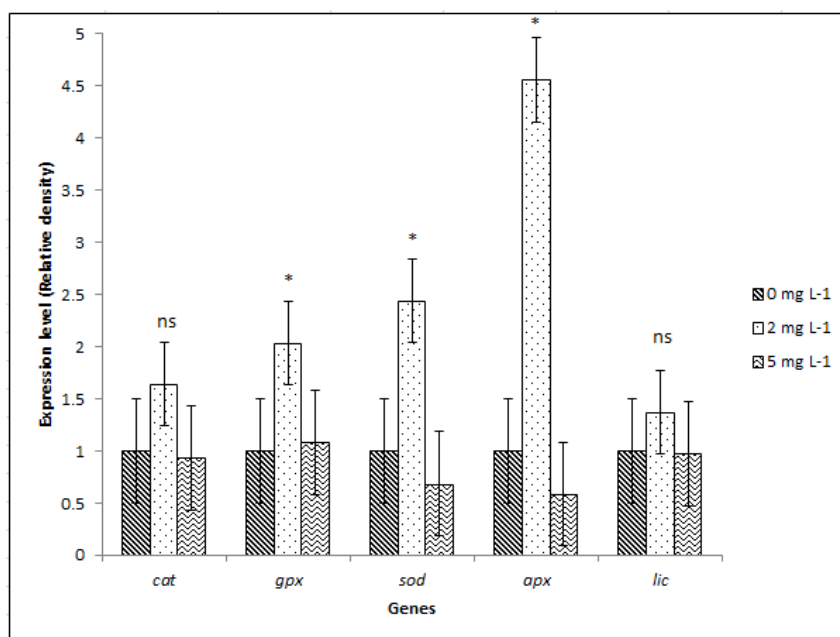


Figure 1. Expression level of fruit antioxidant genes in tomato plants added with selenium (0, 2, and 5 mg L⁻¹) as Na₂SeO₃ via nutrient solution. The values shown indicate the relative expression compared to a control with a value of 1.